



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Composición lipídica en la cutícula de *Aedes aegypti* durante la infección con  
DENV2

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A:  
Karla Yaneli Becerril González

**DIRECTOR:**  
Dr. Humberto Lanz Mendoza

CUERNAVACA, MORELOS

Marzo, 2020

Dedicatoria:

A mis padres, Leticia González Mendoza y Ventura Becerril Hernández, por enseñarme que la vida es de colores, por la libertad que me brindaron, por permitirme elegir mi camino.

Agradecimientos:

Para comenzar, al comité de sínodos encargados de evaluar éste trabajo de investigación, la Mtra. Verónica Chávez López, el Dr. Humberto Lanz Mendoza quienes con sus observaciones y evaluaciones lograron contribuir a la mejora del proyecto. En especial al Dr. Jorge Armando Cime Castillo porque más que mi sínodo fue mi tutor, y mi guía; por instruirme en la Ciencia experimental y por ayudarme en cuanto podía, muchas gracias.

A la Dra. Valeria Vargas Ponce de León, por su paciencia y cariño, por enseñarme a obtener y cuidar el material biológico necesario y por todo el apoyo que me brindó en el proyecto.

A la M. en C. Grecia Gabriela Hernández Díaz por su calidez, pero principalmente por su amistad; agradezco su compañía en las buenas y en las malas, pero sobre todo sus consejos y el haberme escuchado tantas veces.

A mis amigos de laboratorio, Victoria Moyado, Leslie, Carlos Roldán, Juan Tablas, Josué Quevedo, Rafael Tamayo, Edgar Quezada, Cristian Domínguez, y Xavier Serrato, por su compañía y su afecto; por ayudarme a crecer como persona y como Bióloga. Los quiero mucho, gracias.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Alejandro Méndez, Lucila García, Diana Rivera, Yeretzi Olvera, Usiel Santos, Guadalupe Escobedo, Iris Osnaya, Lizeth López, Victoria Soto, Armando Morales, Fernanda Torres, Raúl Bello, Irene García, Jackeline Cerón, Aldair Gallegos, Alexis Téllez, Mónica Bobadilla, Daniel, Mario Albarrán, Alexis López, Damián, Roberto Bahena, Emmanuel Flores, Juan Rodríguez, Olivia Gómez, José Calderón, Susana Sánchez, Mersi , Keyla Torres, Karla Matías, Vanessa Maya, Mario, Aldo Vianey, Hugo, quizás me faltaron muchos más, tuve la fortuna de hacer grandes amistades en la Universidad y sin importar las vueltas de la vida quiero agradecerles el que hayan estado para mí en los momentos que los necesite, desde una plática en las jardineras, o de prisa por los pasillos, hasta un largo sermón, los desvelos en las prácticas de campo, las fiestas, las exposiciones, etc.

Gracias por las experiencias.

A la Universidad Nacional Autónoma de Morelos, por brindarme una educación superior pública, gratuita, y laica.

A L´arrosair de Arthur por ser tan lindos conmigo en todos los aspectos y apoyarme en lo que al tiempo de mi tesis correspondía, Amaury, Benoit, Abraham, Vale, Yoko, Emiliano, David, Claudia, Humberto, Daniel, Zaira, Sam, Isa, muchas gracias.

Kary prima querida, parte de L´arrosair y de mi corazón, gracias por compartir mis simplezas, y brindarme tanto amor, te amo.

Angie, amiga mía, gracias por acompañarme en el trabajo y también en el laboratorio, tu ayuda fue sumamente importante, gracias por acudir a mí, siempre que te lo pedí.

Sara, amiga y compañera, gracias por enseñarme a conocerme, gracias por tu apoyo y tu cariño.

A la cocina, por darme tanto.

A Doña Came, por enseñarme la responsabilidad del trabajo y por ser mi amiga.

A Norma, por lo que fuimos y seremos; eres la mitad de todo lo que tengo, eres mi amor a las experiencias, a los desatinos y a las carcajadas, infinitas gracias.

A Marcos, me enseñaste tantas cosas de la vida que sería imposible describirlas todas.

Y finalmente a mi familia, ustedes son la razón de mis días; no tengo palabras para agradecerles tanto amor, Mamita linda querida, Papiringo de mi corazón, Flaquita, Hermano mayor, Mi pequeño jazmín, Perry mi pequeño arcoíris, Chaparro enano mío y a mí Princesa Lluvita, ustedes son mi círculo de amor, son a quien recorro para compartir mis alegrías y mis temores; no me gustaría estar en ninguna otra parte.

En especial a mi hijo, Marcos Liam Cervantes Becerril. Tu llegada marcó un antes y un después y agradezco tu vida más que todo lo que me ha sucedido, nada me enorgullece más que ser tu mamá. Mi mayor anhelo es que seas en su mayoría feliz y aprendas a vivir y disfrutar tus emociones. Te amo hijo mío.

Los amo.

**"Sabes que soy un hombre muy inteligente. ¿No crees que si estuviera equivocado lo sabría?"**

**Sheldon Cooper**

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Marco teórico</b> .....	3
2.1. Clasificación taxonómica.....	3
2.1.1. Clasificación taxonómica de <i>Aedes aegypti</i> .....	6
2.2. Orden díptera.....	6
2.2.1. Morfología general del orden Díptera.....	7
2.3. Familia <i>Culicidae</i> .....	9
2.4. Morfología de <i>Aedes aegypti</i> .....	10
2.5. Ciclo de vida.....	11
2.6. Alimentación.....	15
2.7. Reproducción.....	16
2.8. La cutícula.....	17
2.8.1. Principales componentes lipídicos.....	20
2.9. DENV2.....	22
<b>3. Ecología química</b> .....	26
3.1 Generalidades de la comunicación química en insectos.....	27
<b>4. Antecedentes</b> .....	29
4.1. Flavivirus, el virus del dengue.....	29
4.2. La cutícula, importancia de los lípidos.....	30
4.2.1 Hidrocarburos cuticulares en insectos.....	31
4.3. Estudios de composición química.....	37
4.4. Interacción virus dengue-vector.....	41
<b>5. Justificación</b> .....	44
<b>6. Hipótesis</b> .....	44
<b>7. Objetivo general</b> .....	45
<b>8. Objetivos específicos</b> .....	45
<b>9. Metodología</b> .....	45
9.1. La crianza.....	45
9.2. Alimentación.....	46
9.3. Infección.....	47
9.4. Protocolo de monitoreo no destructivo del virus dengue en las excretas de <i>Aedes aegypti</i> .....	47
9.5. Post-infección.....	48
9.6. Procedimiento de conservación de cutícula.....	49
9.7. Espectrometría de masas.....	49
9.8. Análisis de las excretas.....	52
<b>10. Resultados</b> .....	55
<b>11. Discusión</b> .....	63

<b>12. Conclusiones</b> .....	66
<b>13. Anexos</b> .....	67
<b>14. Literatura citada</b> .....	72

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-** Morfología, diseño femenino de *Aedes aegypti*.....
- Figura 2.-** Morfología, diseño masculino de *Aedes aegypti*.....
- Figura 3.-** Fotografía de *Aedes aegypti* tomada por microscopía electrónica de aumento. Meckes O. & Ottawa N., Mosquito, (foto) jpg. Recuperado de: <https://www.eyeofscience.de/en/zoology/> .....
- Figura 4.-** Huevos del mosquito *Aedes aegypti*.....
- Figura 5.-** Cosmo, L. (2016). *Nature, Aedes Aegypti* Mosquito stilt, the life cycle. Ideal for informational and institutional related sanitation and care. [image] Available at: <https://sp.depositphotos.com/97504570/stock-illustration-nature-aedes-aegypti-mosquito-stilt.html> [Accessed 15 nov. 2018].....
- Figura 6.-** Una hembra adulta del mosquito de *Aedes aegypti*, en el proceso de adquirir sangre de su huésped humano. Gathany, J. (2016). Alimentación con sangre, hembra de *Aedes aegypti*. [Figura]. Recuperado de Centro de Control de Enfermedades, Biblioteca de imágenes de salud pública, [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes\\_aegypti.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm).....
- Figura 7.-** Alimentación del macho de *Aedes aegypti*, consumo de néctar.....
- Figura 8.-** Apareamiento de *Aedes aegypti*. Enfermedades transmitidas por vector. CENAPRECE. 12-12-14. Jpg.....
- Figura 9.-** Esquema de la estructura de la cutícula vista en corte transversal. Se observan las diferentes capas que constituyen el integumento. (Quesada-Allué, 1987).
- Figura 10.-** Vista general de la epicutícula de un insecto adulto. (Modificado de Gullan y Cranston, 2014)
- Figura 11.-** Disposición espacial de las microfibrillas de quitina, determinando dentro de cada lamela un arreglo helicoidal (Hadley,1986) .....
- Figura 12.-** Estructura viral del DENV, genoma del virus del dengue (modificado Kuhn y col. 2002; Guzmán y COL 2010) .....
- Figura 13.-** Incidencia y Serotipos Aislados de Dengue, por Entidad Federativa. México, 2017. (SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con información al 1 de enero de 2018 y a la semana 52 del 2016) ...
- Figura 14.-** Clasificación de semioquímicos (Cortez, 2013) .....
- Figura 15.-** Fotografía de *Triatoma infestans* (CONABIO, 2012).
- Figura 16.-** Fotografía de *Blattella germanica* (Duran, 2016).



**Figura 17.-** *Reticulitermes grassei* y *Reticulitermes flavipes* (Ratamur, 2012).

**Figura 18.-** *Musca Domestica* (Moscas, 2019, Recuperado de: <https://www.dondevive.org/moscas/>)

**Figura 19.-** *Drosophila melanogaster* (Goetgheluck, 2018).

**Figura 20.-** Esquema de un pelo sensorial de la antena de un insecto (Sellanes, 2011).

**Figura 21.-** Diagrama del ciclo viral intracelular del virus del dengue y la localización subcelular de cada uno de los eventos (Velandia,2011) .....

**Figura 22.-** Circulación del virus del dengue en *Aedes aegypti* (Almukhtar, 2016).

**Figura 23.-**Esquema del método utilizado para recolectar excrementos de mosquitos. Fontaine, A. *et al.* (2016) .....

**Figura 24.-** Esquema general del mecanismo de desviación de iones de fragmentos mediante un imán en un espectrómetro de masas. (Hoffmann, 2001) .....

**Figura 25.-** Gel de agarosa, análisis de comprobación de infección con DENV2 de las muestras individuales del grupo experimental, individuos del 11 al 20.....

**Figura 26.-** Gráfico de abundancia relativa de los iones de ácidos grasos en el grupo experimental.....

**Figura 27.-** Gráfico de abundancia relativa de los iones de ácidos grasos en el grupo control.....

**Figura 28.-** Comparación de ácidos grasos saturados comunes presentes en el grupo experimental y en el grupo control.....

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Número de especies de insectos registradas o estimadas para Canadá, los Estados Unidos de América y México, considerando los ocho órdenes.....	3
<b>Tabla 2.-</b> Clasificación de Nematocera (Díptera) según la propuesta de Wood y Borknet (1989) .....	3
<b>Tabla 3.-</b> Especies lipídicas específicas requeridas por diferentes virus (+) RNA para la replicación exitosa del genoma (Zhang, Z., <i>et al</i> 2019) .....	
<b>Tabla 4.-</b> Concentraciones para llevar a cabo un RT-PCR usando la enzima Superscript III One-Step RT-PCR System.....	27
<b>Tabla 5.-</b> Protocolo en tiempo de RT-Dengue en el termociclador.....	28
<b>Tabla 6.-</b> Resultados de la espectrometría de masas, muestras experimentales.....	29
<b>Tabla 7.-</b> Resultados de la espectrometría de masas, muestras del grupo control....	30
<b>Tabla 8.-</b> Ácidos grasos comunes, presentes en el grupo experimental.....	31
<b>Tabla 9.-</b> Funciones generales de los ácidos grasos presentes en los grupos de estudio.....	35

# 1. Introducción

De acuerdo con la Conabio (2015), en nuestro país existen poco más de 30 mil especies de insectos; sin embargo, de acuerdo con Zhang (2011) México podría albergar hasta el 10% del total de la biodiversidad de insectos a nivel mundial, lo que representaría cerca de 100 mil especies. Deberíamos estudiar los insectos por muchas razones. Sus ecologías son increíblemente variables. Los insectos pueden dominar las cadenas alimentarias y las redes tróficas tanto en volumen como en cantidad. (P.J.Gullan & Craston, 2011). Dentro del diverso y gran mundo de los insectos se encuentra el orden Díptera este es importante por múltiples aspectos, uno de ellos es que son responsables de la transmisión de los agentes causales de enfermedades. Algunas de ellas son la fiebre amarilla, dengue, malaria, la tripanosomiasis africana, filariasis, leishmaniasis, fiebre tifoidea, y diversas encefalitis arbovirales. Este orden alberga muchas especies, una muy relevante para la salud pública a nivel nacional y en Morelos es *Aedes aegypti* causante de la transmisión del dengue. El dengue es hoy la más importante arbovirosis, debido a las afecciones que provoca e implicaciones sociales. El mosquito *Aedes aegypti*, su principal transmisor; convive con el hombre en su hábitat doméstico y peridoméstico. (Martínez, 2008). El complejo dengue lo constituyen cuatro serotipos virales serológicamente diferentes (Dengue 1, 2, 3 y 4) que comparten analogías estructurales y patogénicas, por lo que cualquiera puede producir las formas graves de la enfermedad, aunque los serotipos 2 y 3 han estado asociados a la mayor cantidad de casos graves y fallecidos (Martínez, 2008). El virus del dengue contiene una hebra de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva con un genoma de aproximadamente 11 kb, durante la infección el ARN viral es traducido en una poliproteína, la cual se divide en proteínas estructurales (C, M, E) y proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) las cuales son expresadas dentro de la célula del hospedero infectada (Martínez, 2008). Los virus del dengue pertenecen al género Flavivirus de la familia Flaviviridae. (Gubler, 1998). Los virus como agentes infecciosos obligados manifiestan una dependencia exclusivamente del huésped para cumplir sus requisitos de membrana y lípidos. Los virus utilizan membranas lipídicas derivadas del huésped para facilitar la liberación de las células

infectadas mediante la gemación y la penetración de las células a través de la fusión de la membrana. Dicho requerimiento sugiere que pueden existir cambios cuantificables en el repertorio lipídico de las células formadoras de membranas intracelulares, las cuales soportan la replicación y el ensamblaje del ARN viral. La identificación de éstos cambios en los lípidos que ocurren durante la infección es un primer paso necesario para descubrir cómo el DENV y sus proteínas constituyentes modifican el metabolismo de los lípidos de las células. (Perera R, 2012)

## 2. Marco teórico

### 2.1 Clasificación taxonómica

Los artrópodos son el filo más diverso de los metazoos (animales pluricelulares), con más de un millón de especies descritas. Incluyen, entre otros grupos, a las arañas, insectos, crustáceos y miriápodos (Ribera *et al*, 2015). Se desconoce el número exacto de especies de artrópodos descritas y válidas (es decir, que no son sinonimias), pero se estima que sobrepasa los 1,3 millones (Zhang, 2013).

Se ha estimado que el orden Díptera pudiera estar representado por alrededor de 20,000 especies en México (Morón, 1993). Tomando como base un gran número de trabajos taxonómicos entre los que destacan monografías, catálogos, listados, revisiones y artículos taxonómicos aislados, se sabe que el orden Díptera está representado en México por al menos 83 de las 140 familias reconocidas en el mundo, pertenecientes a los dos subórdenes: Nematocera y Brachycera (McAlpine, 1981; 1986; Papavero (ed.), 1965-1985; Stone, 1965).

En este caso nos enfocaremos en el suborden Nematocera. En este caso se incluyen las especies a la fecha conocidas de los infraórdenes Tipulomorpha, Blephariceromorpha, Axymyiomorpha, Bibionomorpha, Psychodomorpha, Ptychopteromorpha y Culicomorpha. Éste último es al que pertenece la superfamilia Culicoidea y dentro de ella se localiza la familia Culicidae. (Ibáñez & Hernández, 2006).

Dentro de dicha familia encontramos las cerca de 3500 especies conocidas en el mundo, de las cuales se conocen 147 especies en Norteamérica y más de 300 de Centroamérica al sur de México.

Este grupo ha sido ampliamente trabajado en México debido a su importancia médica y veterinaria, por lo que a la fecha se tiene un total de 247 especies pertenecientes a 20 géneros, mismas que se incluyen en el catálogo asociando todas las sinonimias conocidas. (Ibáñez-Bernal, 1996).

Considerando los ocho órdenes según García-Aldrete (1988) México tiene una estimación de 20,068 de especies del orden Díptera (Tabla 1).

Dentro del orden díptera encontramos una clasificación según la propuesta de Wood y Borknet (1989), donde se encuentra la familia de nuestro interés; la familia *Culicidae* (Tabla 2).

La Familia Culicidae (zancudos, mosquitos) merece particular atención en todo el mundo, dada la importancia médica y veterinaria de éstos como reservorio y vectores de enfermedades. Son potenciales vectores biológicos de distintos tipos de virus, protozoos y nemátodos, afectando tanto al hombre como a los animales domésticos. (González, 2016).

ORDENES	Canadá (Danks, 1979; más estimación máxima)	Estados Unidos y Canadá (USDA, 1952)	México(estimación mínima de los autores)
ODONATA	194 + 3	425	518
HEMIPTERA	3,079 + 1,147	4,500	5,590
PSOCOPTERA	72 + 31	150	500*
THYSANOPTERA	102 + 144	500	618
COLEOPTERA	6,748 + 2,368	28,600	35,586
HYMENOPTERA	6,028 + 10,637	16,300	20,278
LEPIDOPTERA	4,692 + 2,042	11,000	13,684
DIPTERA	7,058 + 7,406	16,130	20,068

\* Según García-Aldrete (1988)

**Tabla 1.-** Número de especies de insectos registradas o estimadas para Canadá, los Estados Unidos de América y México, considerando los ocho órdenes (García-Aldrete, 1988).

INFRAORDEN	SUPERFAMILIA	FAMILIA	Con registros en México	
Tipulomorpha	Tipuloidea	Tipulidae <sup>1</sup>	✓	
		Limoniidae	✓	
		Pediciidae	✓	
		Cylindrotomidae		
Blephariceromorpha	Blephariceroidea	Blephariceridae	✓	
		Deuterophlebiidae		
	Nymphomyioidea	Nymphomyiidae		
Axymyiomorpha	-----	Axymyiidae		
Bibionomorpha	Pachyneuroidea	Pachyneuridae		
	Bibionoidea	Bibionidae <sup>2</sup>	✓	
	Sciaroidea	Mycetophilidae	Sciariidae	✓
			Bolitophilidae	
			Ditomyiidae	✓
			Diadocidiidae	
			Hesperinidae	
			Keroplastidae	✓
			Lygistorrhinidae	
			Rangomaramidae	
			Cecidomyiidae	✓
			Psychodomorpha	Psychodoidea
		Trichoceroidea	Perissomatidae	
	Trichoceridae		✓	
	Anisopodidae		✓	
	Scatopsidae		✓	
	Synneuridae			
Ptychopteromorpha	Ptychopteroidea	Ptychopteridae		
		Tanyderidae		
Culicomorpha	Culicoidea	Dixidae	✓	
		Corethrellidae	✓	
		Chaoboridae	✓	
		Culicidae	✓	
		Chironomoidea	Thaumaleidae	
			Simuliidae	✓
			Ceratopogonidae	✓
		Chironomidae	✓	
<b>TOTALES: 7</b>	<b>11</b>	<b>36</b>	<b>21 familias en México</b>	

<sup>1</sup> Algunos autores retienen el uso de Tipulidae *s. lato* para incluyen como subfamilias a Cylindrotomidae y Limoniidae, aun cuando a la fecha la mayoría de especialistas consideran estos taxa como familias independientes.

<sup>2</sup> Incluye a Pleciidae de otros autores considerada como subfamilia, siguiendo a Fitzgerald (2000).

**Tabla 2.-** Clasificación de Nematocera (Diptera) según la propuesta de Wood y Borknet (1989).

### 2.1.1 Clasificación taxonómica de *Aedes aegypti*

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Culicidae

Género: *Aedes*

Especie: *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

## 2.2 Orden díptera

El orden Díptera constituye uno de los órdenes con mayor riqueza de especies, varias de ellas muy abundantes, estando presentes en prácticamente todas las áreas terrestres del planeta. Los dípteros están muy especializados a la gran diversidad de microambientes y recursos que emplean para la crianza y su alimentación; tal especialización se refleja en la gran riqueza de especies, con estilos de vida muy particulares, por lo que ha sido considerado como uno de los grupos de organismos más importantes y diversificados en el contexto mundial. (Ibáñez & Hernández, 2006).

Es uno de los grupos de organismos más grandes, reuniendo más de 150.000 especies conocidas (Yeates, 1999). Los Dípteros han colonizado todos los continentes, incluyendo la Antártida y prácticamente todos los ambientes, excluyendo, al igual que la gran mayoría de los insectos, el mar abierto. (González, 2016).

Cuentan con una amplia distribución, se pueden encontrar en todos los hábitats imaginables terrestres y dulceacuícolas y en todos los continentes. Latitudinalmente, se les pueden encontrar desde el extremo norte de Groenlandia hasta las costas de la Antártida, donde son los únicos insectos de vida libre.



Se encuentran desde las mareas bajas hasta las nieves perpetuas a 6.200 m en el Everest. El único medio que no han podido conquistar es el marino, aunque se les puede encontrar en todos los tipos de costas (arenosas, rocosas, acantilados, etc.), así como en aguas salobres y salinas. (Miguel Carles, 2015).

### 2.2.1 Morfología general del orden Díptera

Los díptera son organismos holometábolos y pertenecen al grupo de los insectos están caracterizados por tres segmentos: cabeza, tórax y abdomen. Cada segmento a su vez se encuentra dividido en varias partes.

**La cabeza:** Está conformada por la frente en la parte superior de la cabeza y en la parte posterior se encuentra la cara, se localizan también las antenas que varían de tamaño y están divididas en segmentos donde el primero se llama escapo, el segundo segmento es el pedícelo y del siguiente segmento hasta el último son llamados flagelos, los flagelos son divididos asimismo en flagelómeros.

Los ocelos (ojos simples) se presentan generalmente en número de tres, dispuestos en forma triangular sobre un área denominada triángulo ocelar o tubérculo ocelar los cuales pueden faltar totalmente o haber sólo dos.

El aparato bucal también llamado proboscis o probóscide puede haber dos tipos, el primero chupador y el segundo de tipo picador-chupador, unidos al aparato bucal se encuentran los palpos. (Miguel Carles, 2015).

**El tórax:** El cual está dividido en tres partes que constan del protórax, el mesotórax, la parte más grande y que a su vez está conformado por el mesonoto y el escutelo donde debajo de éste último se encuentra el postescutelo, por último, está el metatórax y en cada uno de estos segmentos se localizan un par de patas.

A cada lado del tórax se encuentran dos orificios respiratorios llamados espiráculos torácicos.

Los apéndices más destacables del tórax son las alas que son dos y es el motivo por el cual se le da el nombre de Díptera: dos alas, aunado a los halterios y las patas. (Miguel Carles, 2015).

### **El abdomen:**

Puede presentar una cintura basal, está segmentado y el número de segmentos es variable cada uno consta de dos placas, en general bien quitinizadas: una dorsal llamada terguito y otra ventral llamada esternito. Entre ambas placas se encuentra una zona membranosa con los orificios respiratorios o espiráculos abdominales.

La parte más importante del abdomen es la genitalia, aparato genital, terminalia o hipopigio que se encuentra al final del mismo y es fundamental para la identificación de las especies, una característica muy importante de los dípteros y de los artrópodos en general es la quetotaxia, que es la disposición del conjunto de sedas (pelos y cerdas) presentes en las diferentes partes de la cabeza y el cuerpo de los insectos y se utiliza para la identificación de géneros y especies.

El tamaño, número y disposición de las sedas es extremadamente importante en la taxonomía de este grupo de insectos, tanto a nivel familiar como específico. Las sedas más importantes para el uso de la quetotaxia son las de la cabeza, el tórax y las patas. (Miguel Carles, 2015).

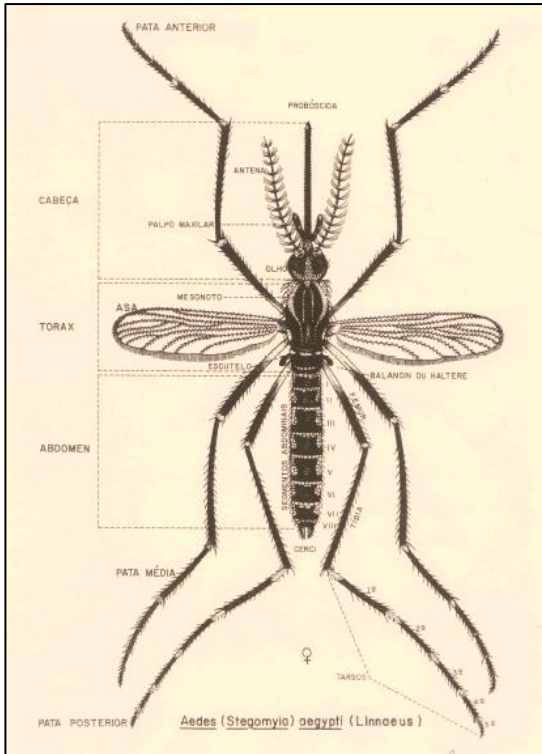


Figura 1. Morfología, diseño femenino de *Aedes aegypti*.

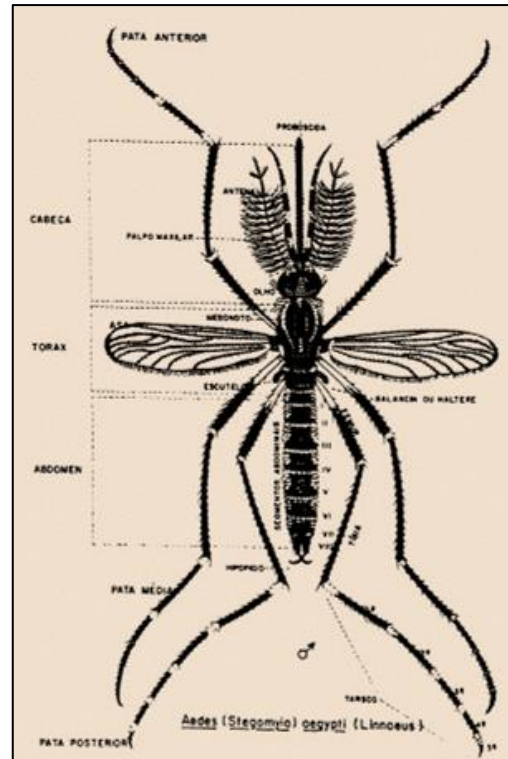


Figura 2. Morfología, diseño masculino de *Aedes aegypti*.

Santana, D., Caroline, A. (2012). Diseño femenino *A. aegypti*. [Figura]. Recuperado de <http://deolhonoaedesaeegypti.blogspot.com/p/mitos-e-verdades.html>

### 2.3 Familia Culicidae

Los Culicidae proliferan preferentemente en climas cálidos, húmedos y de baja altitud sobre el nivel del mar (Weaver y Reisen, 2010). No se cuenta con suficiente información sobre la correlación que pudiera existir entre su diversidad y abundancia en diferentes zonas micro climáticas. (Gómez, 2013).

Los adultos de culícidos son pequeños de entre 3,0 a 9,0 mm de largo, cuerpo, patas y alas alargadas, con colores variables; superficie corporal cubierta de escamas, sedas y fina pilosidad lo que otorga patrones de ornamentación característicos para cada especie. Antenas largas y filamentosas, alas largas y delgadas, con escamas y con un característico patrón de venas bastante uniforme al interior de la familia.

Las larvas de mosquitos ocupan una amplia variedad de micro hábitas, encontrándose en cuerpos de agua temporales o permanentes, aunque un gran número de especies son también encontradas en agujeros de árboles, rocas y plantas epífitas. La mayoría de las larvas se alimentan de las partículas en suspensión y microorganismos que extraen del agua con los cepillos bucales filamentosos. (González, 2016).

## 2.4 *Aedes aegypti*, biología general

*Aedes aegypti* se encuentra dentro del orden díptera y forma parte de la familia *Culicidae*, es un mosquito de coloración oscura, con franjas plateadas en sus patas y dorsalmente una estructura en forma de lira, también plateada, sobre el tórax.

Es un mosquito huidizo y silencioso, de hábitos diurnos, que reposa habitualmente sobre superficies oscuras y pica preferentemente durante las últimas horas del atardecer y las primeras del amanecer. Cuando una hembra completa su alimentación (2 a 3 cm<sup>3</sup> de sangre) desarrollará y pondrá huevos dispersos en distintos lugares lo que asegura la viabilidad de la especie. (Eiman, 2016)

La hembra es atraída hacia recipientes oscuros o sombreados con paredes duras y lisas, prefiere aguas relativamente limpias con poco contenido de materia orgánica y en el momento de colocar sus huevos, utilizará cualquier recipiente que tenga disponible, independientemente del estado de contaminación del agua. (Eiman, 2016).



**Figura 3.-** Fotografía de *Aedes aegypti* tomada por microscopía electrónica de aumento.

Meckes O. & Ottawa N., Mosquito, (foto) jpg. Recuperado de: <https://www.eyeofscience.de/en/zoology/>.

## 2.5 Ciclo de vida

El mosquito *Aedes aegypti* cuenta con un ciclo biológico conformado por cuatro estadios los cuales son:

### a) Huevo

Mide aproximadamente 1 milímetro de longitud, en forma de cigarro y en el momento de postura son blancos, pero muy rápidamente adquieren un color negro brillante.

Son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa en 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido, pero puede prolongarse hasta cinco días con temperaturas más baja.

Eclosionan en un lapso de 2 a 3 días. Con posterioridad a ese periodo, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas con sobrevividas de 7 meses a un año.

Una vez completado el desarrollo embrionario, un porcentaje reducido de huevos pueden resistir largos períodos de desecación, y pueden prolongarse por más de un año en algunas ocasiones.

La capacidad de resistencia a la desecación es uno de los principales obstáculos para el control del mosquito y ésta condición, además, permite transportarlos a grandes distancias en recipientes secos. (Montero, 2009).



**Figura 4.-** Huevos del mosquito *Aedes aegypti*.

Gathany, J. (2016). Huevos del mosquito *Aedes aegypti*. [Figura]. Recuperado de Centro de Control de Enfermedades, Biblioteca de imágenes de salud pública, [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes\\_aegypti.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm)

#### **b) Larva**

Los huevos eclosionan dando lugar a formas larvarias, acuáticas, nadadoras, de respiración aérea, que se alimentan por filtración de material en suspensión o acumulado en paredes y fondo del recipiente, para lo cual utilizan las cerdas bucales en forma de abanico. Se asemejan a otras larvas de mosquitos por la cabeza y tórax ovoides y el abdomen con 9 segmentos.

El segmento posterior (anal) del abdomen tiene 4 branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón corto (que las distingue de otras especies de mosquitos) para la respiración en la superficie del agua. La posición en reposo en el agua es casi vertical y se desplazan en el medio líquido con un movimiento serpenteante característico.

Son fotosensibles (sensibles a la luz), al iluminarlas se desplazan al fondo del recipiente casi de inmediato. La fase larval es el período de mayor alimentación, crecimiento y vulnerabilidad en el ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el recipiente. El estadio larval a su vez está dividido en cuatro etapas L1, L2, L3 y L4.

En condiciones óptimas (temperaturas de 25°C a 29°C) el período desde la eclosión hasta la pupación es de 5 a 7 días, habitualmente es de 7 a 14 días. Las larvas no pueden resistir temperaturas inferiores a 10°C o superiores a 45°C, a menos de 13°C se interrumpe el pasaje a estado de pupa. (Eiman, 2016).

### **c) Pupa**

Las pupas no se alimentan, presentan un estado de reposo donde se producen importantes modificaciones anatómico-fisiológicas hasta la aparición de los adultos. (Montero, 2009).

Reaccionan inmediatamente a estímulos externos tales como vibración y se desplazan activamente por todo el recipiente. Se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad y ésta propiedad facilita la emergencia del insecto adulto. El período pupal dura de 1 a 3 días en condiciones favorables, con temperaturas entre 28 y 32°C.

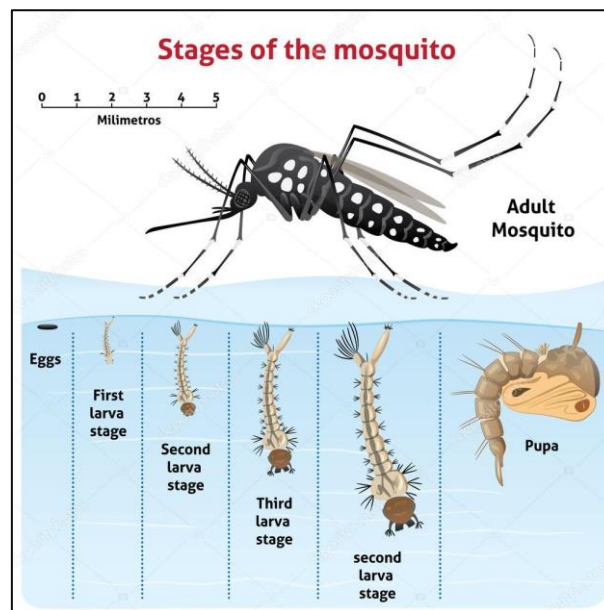
Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período. La pupa tiene en la base del tórax un par de tubos respiratorios o trompetas que atraviesan la

superficie del agua y permiten la respiración. En la base del abdomen poseen un par de remos, paletas o aletas natatorias que sirven para el nado. (Montero, 2009).

#### d) Adulto

El ciclo completo del *Aedes aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en aproximadamente 10-15 días. Al emerger de la pupa, el insecto adulto permanece en reposo permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y las alas.

El adulto emergente es un mosquito de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira", en el dorso del tórax, y mostrando un anillado característico a nivel de tarsos, tibia y fémures de las patas (Ministerio de Salud, 2014). En la figura 5 se observa el ciclo de vida completo de *Aedes aegypti*.



**Figura 5.-** *Aedes aegypti* Mosquito, the life cycle.

Cosmo, L. (2016). *Nature, Aedes Aegypti* Mosquito stilt, the life cycle. Ideal for informational and institutional related sanitation and care. [image] Available at: <https://sp.depositphotos.com/97504570/stock-illustration-nature-aedes-aegypti-mosquito-stilt.html> [Accessed 15 nov. 2018].



## 2.6 Alimentación

La alimentación de las hembras es distinta a la de los machos debido a que las hembras son artrópodos hematófagos, pero también se alimentan de néctar de flores, mientras que los machos sólo se alimentan de sustancias azucaradas.

En la figura 6 se muestra una hembra de *Aedes aegypti* alimentándose de sangre humana y en la figura 7 un macho de *Aedes aegypti* alimentándose de néctar de una planta.

Las hembras se alimentan de sangre humana y los machos de néctar de las flores (Brusca, 2005).



**Figura 6.-** Una hembra adulta del mosquito de *Aedes aegypti*, en el proceso de adquirir sangre de su huésped humano.

Gathany, J. (2016). Alimentación con sangre, hembra de *Aedes aegypti*. [Figura]. Recuperado de Centro de Control de Enfermedades, Biblioteca de imágenes de salud pública, [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes\\_aegypti.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm).



**Figura 7.-** Alimentación del macho de *Aedes aegypti*, consumo de néctar.

## 2.7 Reproducción

Dentro de las 24 horas siguiente a la emergencia pueden aparearse iniciándose la etapa reproductora del insecto.

El sonido emitido por el batido de las alas de las hembras durante el vuelo atrae al macho hacia ella, pero una vez que la hembra ha tenido su alimentación sanguínea ocurren pocos apareamientos, porque ella debe batir sus alas con mayor rapidez para compensar el aumento de peso y este aumento en la frecuencia del movimiento de las alas no es atractivo para los mosquitos machos. (Montero, 2009).

El apareamiento en general se realiza durante el vuelo, pero en algunas ocasiones se lleva a cabo en una superficie horizontal o vertical

. Al aparearse, el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su edeago dentro del receptáculo genital de la hembra, la bolsa copulatriz de la hembra se llena de espermatozoides, el que pasa a la espermateca en uno o dos minutos. Esa inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produce durante toda su vida. (Montero, 2009).



**Figura 8.-** Apareamiento de *Aedes aegypti*.

Enfermedades transmitidas por vector. CENAPRECE. 12-12-14. Jpg.

## 2.8 La cutícula de *Aedes aegypti*

Los insectos y los artrópodos se construyen en un plan segmentario, y su característica es un exoesqueleto de articulación dura. La cutícula, que forma el exoesqueleto es continua en todo el exterior del cuerpo y consiste en una serie de placas duras, los escleritos, unidos entre sí por membranas flexibles también son cuticulares. (Chapman, 2013).

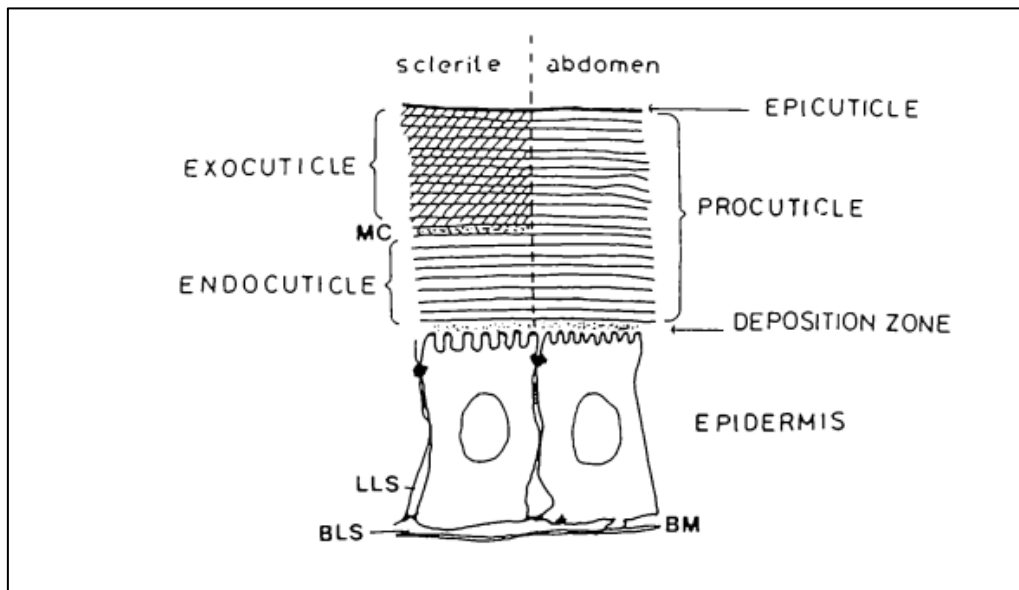
La cutícula es una estructura extracelular estratificada secretada por la epidermis, que recubre toda la superficie del cuerpo del animal actuando como exoesqueleto y como tegumento protectorio.

Estudios de microscopía óptica han permitido determinar la existencia de dos grandes divisiones estructurales: una capa externa delgada y amorfa denominada epicutícula, y una capa interna mucho más gruesa llamada procutícula (Wigglesworth, 1939).

Con la aparición de la microscopía electrónica, se pudo determinar la estructura fina de estas dos capas cuticulares. (Wappner, 1995). La figura 9 muestra un corte transversal de la estructura de la cutícula.

La epicutícula es fundamental para la economía hídrica del insecto como barrera hidrófuga y tiene una composición altamente hidrofóbica, siendo algunos de sus componentes sumamente resistentes a los procesos extractivos. La procutícula es la capa interna, mucho más gruesa que la epicutícula.

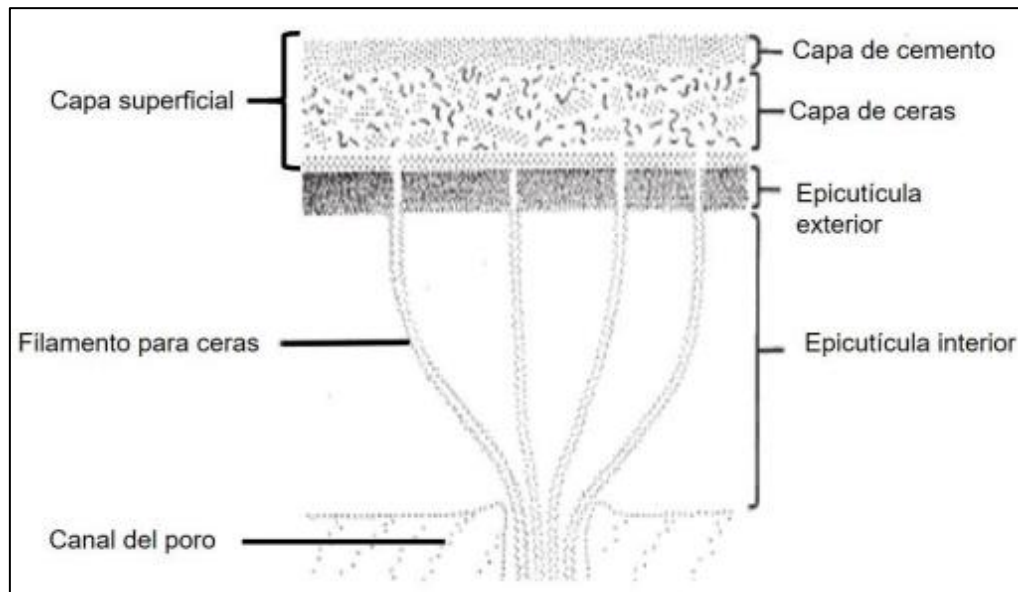
Está constituida principalmente por quitina (Quesada-Allué, 1982; Quesada-Allué y col., 1976; Kramer y Koga, 1986; Cabib, 1972) y proteínas (Boccaccio y Quesada-Allué, 1989; 1994; Cox, 1987; Wappner y Quesada-Allué, 1993). La procutícula, a su vez se divide en dos regiones: -17 la capa más interna es la denominada endocutícula con un espesor de entre 10 y 200  $\mu\text{m}$  y una capa externa más delgada llamada exocutícula que es la región donde se lleva a cabo el proceso de esclerotización. (Wappner,1995).



**Figura 9.-** Esquema de la estructura de la cutícula vista en corte transversal. Se observan las diferentes capas que constituyen el integumento. (Quesada-Allué, 1987).

En los lípidos o ceras de la capa superficial en la cutícula están depositados lípidos hidrofóbicos, ésteres de cera, ésteres de esterol, cetonas, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, e hidrocarburos de cadena lineal, que en conjunto son llamados HC, y ayudan a evitar el paso del agua e influyen en el comportamiento de los insectos al interactuar intra e interespecíficamente (Vrkoslav *et al.* 2010, Gullan y Cranston 2014).

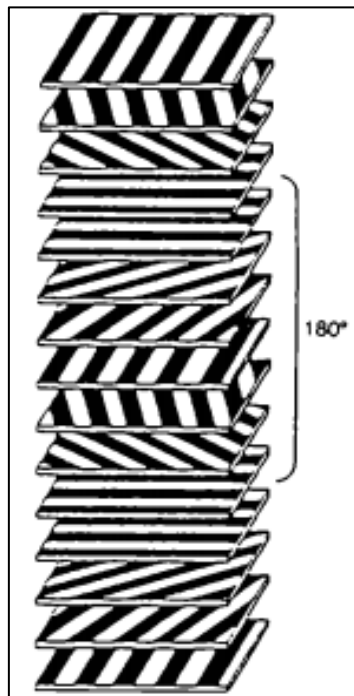
En la figura número 10 se puede observar con mayor precisión la capa de ceras mencionada anteriormente y los filamentos para ceras que interactúan con ésta.



**Figura 10.-** Vista general de la epicutícula de un insecto adulto. (Modificado de Gullan y Cranston, 2014)

La combinación de quitina y proteínas le permite a la cutícula soportar esfuerzos mecánicos de importancia sin llegar a fracturarse. Las propiedades mecánicas de la cutícula no dependen sólo de las sustancias que la componen, sino que también de un ordenamiento espacial muy peculiar de la quitina y las proteínas en la procutícula. Las microfibrillas se ordenan en planos paralelos a la superficie cuticular constituyendo láminas.

Las láminas, a su vez, se superponen unas sobre otras dando lugar a la formación de lamelas. Las microfibrillas se orientan siempre en un plano paralelo a la superficie cuticular, pero, en el plano perpendicular a ella, van variando su orientación entre una lámina y la siguiente de manera que terminan configurando un patrón helicoidal dentro de cada lamela. Esto se puede observar con mayor claridad en la figura 11.



**Figura 11.-** Disposición espacial de las microfibrillas de quitina, determinando dentro de cada lamela un arreglo helicoidal (Hadley,1986).

### 2.8.1 Principales componentes lipídicos

Los lípidos cuticulares juegan un papel crítico en la supervivencia de los insectos en los diferentes ambientes terrestres (Blomquist *et al.*, 1987).

Es posible que los lípidos cuticulares específicos desempeñen un papel en el reconocimiento de presas por parte de insectos especializados y depredadores. Los lípidos cuticulares pueden contener hidrocarburos, ácidos grasos libres (FFA), alcoholes, ceras, glicéridos, aldehídos y esteroides. El perfil de FFA puede diferir entre

grupos de insectos, y algunas veces dentro de las etapas de desarrollo de la misma especie (Kazek, 2019).

La epicutícula, tiene como principales constituyentes proteínas, glicoproteínas, que pueden ser esclerotizadas por quinonas, camada cerosa y lípidos, especialmente hidrocarburos como alcanos y alquenos (NATION, 2002; YE et al., 2007).

Se tiene registro de los componentes lipídicos más abundantes en una cepa llamada C6/36 de células de mosquitos, la primera línea celular de *Aedes albopictus*. Los cuales son los siguientes:

- Fosfatidilcolina (PC), 39.2%
- Fosfatidiletanolamina (PE), 31,2%
- Fosfatidilserina (PS), 0,8%;
- Esfingomielinas (SM), 18.5%;
- Ceramida (CER), 5,3%;
- Lisofosfolípidos, 0,8%
- Ceramida fosfoetanolamina (CER-PE), 4%.

Se ha informado anteriormente que estos lípidos representan el 6-13% del lipidoma de las células de mosquito. (Perera R, 2012).

Si bien los componentes mayoritarios de la cutícula son proteínas y quitina, constituida por polímeros de N-Acetilglucosamina (Neville, 1975), la epicutícula está compuesta de una mezcla compleja de lípidos no polares.

Predominan hidrocarburos (HC) lineales y ramificados de muy largas cadenas (entre 20 y 40 átomos de carbono), alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres de variadas estructuras (Blomquist y Jackson, 1979; Juárez y col., 1984; Blomquist y Dillwith, 1985; Juárez y Brenner, 1985; Blomquist y col, 1987; Lockey, 1988; Nelson y Blomquist, 1995; Juárez y Calderón, 2007).

Los ácidos grasos tienen una nomenclatura, un nombre químico debe describir la estructura química de forma inequívoca. Para los ácidos grasos, esto se hace usando

la nomenclatura sistemática recomendada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada [Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB, 1978].

El sistema IUPAC nombra los ácidos grasos únicamente sobre la base del número de átomos de carbono, el número y la posición de los ácidos grasos insaturados en relación con el grupo carboxilo. También se identifican la configuración de los dobles enlaces, la ubicación de las cadenas ramificadas, los heteroátomos y otras características estructurales (Nimal, 2009).

Otro sistema que se usa ampliamente es el sistema delta, en el que la clasificación se basa en el número de átomos de carbono interpuestos entre el carbono carboxilo y los dobles enlaces más cercanos al grupo carboxílico. Este sistema especifica la posición de todos los dobles enlaces, así como su configuración cis / trans. Hay varias notaciones abreviadas para los ácidos grasos, pero todos adoptan la forma C: D, donde C es el número de átomos de carbono y D es el número de dobles enlaces en la cadena de carbono. (Nimal, 2009).

## 2.9 DENV2

La gran cantidad de pacientes infectados con DENV cada año, estimada por la Organización Mundial de la Salud en 390 millones, hace de DENV el arbovirus más peligroso del mundo (Melo, C., *et al* 2018).

La transmisión del virus del dengue es netamente vectorial, siendo *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* las especies involucradas en nuestro país, más sin embargo nos centramos en *Aedes aegypti* como se ha mencionado anteriormente.

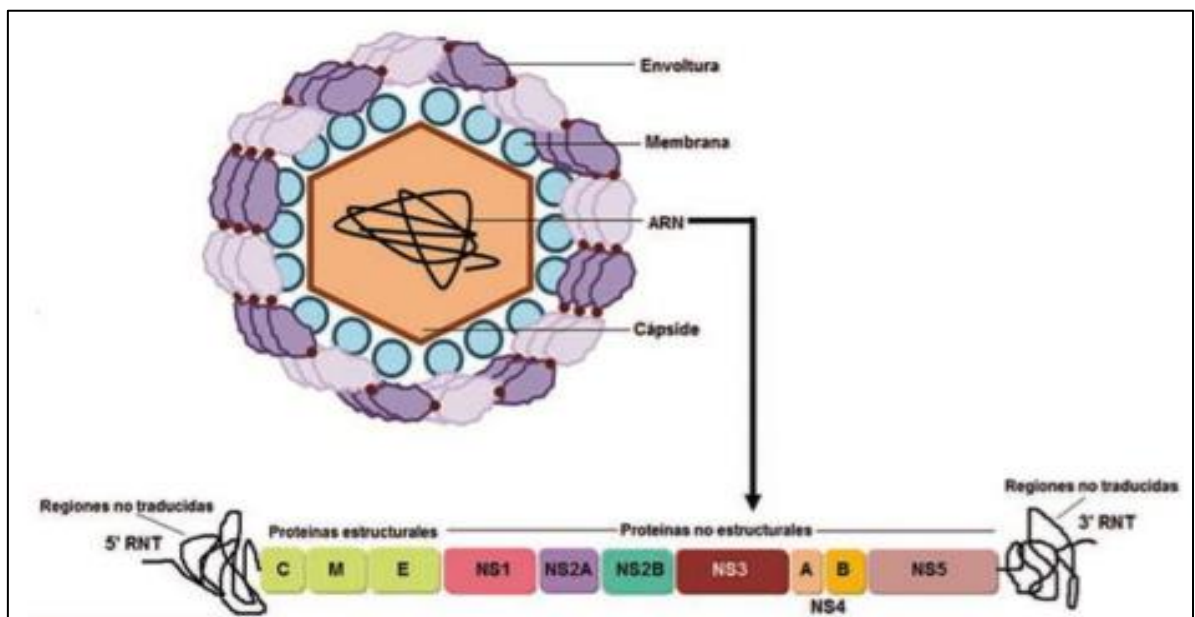
No existe el contagio persona a persona, salvo contadas excepciones, de transmisión vertical (de madre a recién nacido), descritas en la literatura científica. La hembra de *Aedes aegypti* adquiere el virus al alimentarse sobre una persona en período de viremia (con el virus circulante en su sangre).



El virus se replica en el intestino del mosquito y desde ahí migra hacia sus glándulas salivales en las que queda disponible para infectar a otras personas a través de una nueva picadura manteniendo la cadena persona infectada-vector-persona susceptible.

Todo este ciclo, dependiente de la temperatura ambiente, ocurre en el interior del organismo del mosquito (llamado período de incubación extrínseco) y dura entre 8 y 12 días. (Eiman, 2016).

Dentro de los Flavivirus transmitidos por mosquitos se encuentran los cuatro serotipos de DENV (DENV1, DENV2, DENV3 Y DENV4). Los cuatro virus son antigénicamente y genéticamente distintos éstos causan enfermedades similares en humanos (Lindenbarh B. 2007; Llalslead 2000). En la siguiente figura (11) se puede observar la estructura viral del dengue.



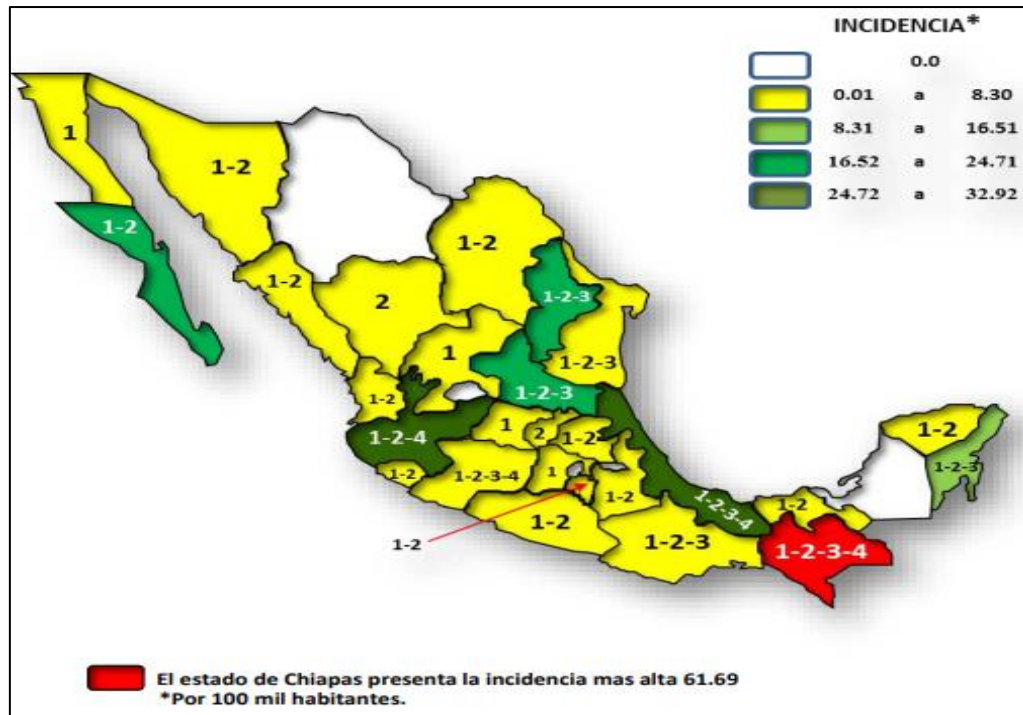
**Figura 12.-** Estructura viral del DENV, genoma del virus del dengue (modificado Kuhn y col. 2002; Guzmán y COL 2010).

La morbilidad y mortalidad causadas por la infección por DENV, están dadas por la complejidad de eventos que se presentan en el transcurso de la infección. Algunos pacientes desarrollan cuadros febriles y dolores generalizados que se resuelven rápidamente sin dejar secuelas. A este tipo de manifestación clínica se le conoce como dengue (fiebre de dengue).

Otros pacientes, por el contrario, presentan dolores intensos, fiebre alta e incrementos en la permeabilidad vascular, lo que conlleva a la pérdida de plasma y hemorragias pleurales y gastrointestinales, entre otros.

Estos signos son agrupados en dos entidades clínicas conocidas como dengue con signos de alarma y dengue grave con manifestaciones hemorrágicas o sin ellas, llamado anteriormente dengue hemorrágico, o fiebre hemorrágica por dengue (Velandia, 2011). Durante una infección secundaria el gradiente de severidad de los serotipos varía y se considera que es en el siguiente orden: DENV2 > DENV3 > DENV1 > DENV4 (Guzmán y col. 2000).

La incidencia del dengue ha aumentado de manera constante en México, de 1.7 casos por 100 000 habitantes en el año 2000 a 43.03 casos por 100 000 habitantes en el 2012, tal y como se observa en la figura 11, debido a la urbanización creciente, sin controles adecuados, a la migración humana, a factores asociados al cambio climático con modificaciones en el ámbito ecológico, que han redundado en una expansión de los vectores, *Aedes aegypti* y *A. albopictus*. (Uribarren, 2018).



ESTADO	SEROTIPOS CIRCULANTES				TOTAL
	1	2	3	4	
AGUASCALIENTES	0	0	0	0	0
BAJA CALIFORNIA	3	0	0	0	3
BAJA CALIFORNIA SUR	2	151	0	0	153
CAMPECHE	0	0	0	0	0
CHIAPAS	19	943	31	1	994
CHIHUAHUA	0	0	0	0	0
COAHUILA	8	9	0	0	17
COLIMA	20	18	0	0	38
DISTRITO FEDERAL	0	0	0	0	0
DURANGO	0	5	0	0	5
GUANAJUATO	39	0	0	0	39
GUERRERO	42	20	0	0	62
HIDALGO	2	15	0	0	17
JALISCO	1441	585	0	1	2027
MEXICO	89	0	0	0	89
MICHOACAN	308	2	3	1	314
MORELOS	7	43	0	0	50
NAYARIT	57	30	0	0	87
NUEVO LEON	54	878	1	0	933
OAXACA	171	112	2	0	285
PUEBLA	128	1	0	0	129
QUERETARO	0	2	0	0	2
QUINTANA ROO	36	141	3	0	180
SAN LUIS POTOSI	520	123	1	0	644
SINALOA	7	6	0	0	13
SONORA	21	5	0	0	26
TABASCO	16	8	0	0	24
TAMAULIPAS	28	93	7	0	128
TLAXCALA	0	0	0	0	0
VERACRUZ	726	179	22	2	929
YUCATAN	8	7	0	0	15
ZACATECAS	3	0	0	0	3
<b>Total</b>	<b>3755</b>	<b>3376</b>	<b>70</b>	<b>5</b>	<b>7206</b>

**Figura 13.-** Incidencia y Serotipos Aislados de Dengue, por Entidad Federativa. México, 2018. (SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con información al 1 de enero de 2018 y a la semana 52 del 2018.)

### 3. Ecología química

En el siglo XX surge la ecología química, conduciendo al estudio de las sustancias químicas involucradas en las interacciones ecológicas intra e interespecíficas de organismos vivos (Ruther *et al.*, 2002).

La producción de diversos compuestos químicos por los organismos y su liberación al ambiente, afecta significativamente las condiciones de éste e influye sobre el crecimiento, la salud, la conducta y en suma la biología poblacional de plantas, animales y microorganismos, de modo distinto al relacionado con la nutrición; este hecho determina la existencia de interacciones bióticas particulares, las interacciones químicas entre los organismos (Anaya, 1994).

La ecología química se enfoca principalmente en estudios sobre el papel de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, la comunicación por medio de feromonas y semioquímicos, alelopatía y la búsqueda de metabolitos con acción biológica diversa.

El mundo natural, en relación con muchas interacciones ecológicas entre organismos, tiene una cierta estructura detectable y entendible, en la cual, hay una compleja serie de atributos químicos de los organismos, que hoy conocemos como infoquímicos, y que desempeñan un papel fundamental en la estructuración de la naturaleza. (Dirzo y Anaya, 1989).

### 3.1 Generalidades de la comunicación química en insectos

Los animales utilizan diferentes canales de comunicación, el canal químico es el más antiguo y es compartido por una gran diversidad de organismos. Los compuestos químicos que median la comunicación entre organismos son denominados semioquímicos.

Estas señales químicas (o semioquímicos) tienen varias ventajas en la comunicación de largo alcance, bajo costo de producción, son efectivas en pequeñas cantidades, traspasan barreras físicas y pueden ser transportadas por el viento (Adams, 2007).

En la figura 14 se muestra una clasificación de los semioquímicos y el tipo de interacción en el que son utilizadas dichas señales químicas.

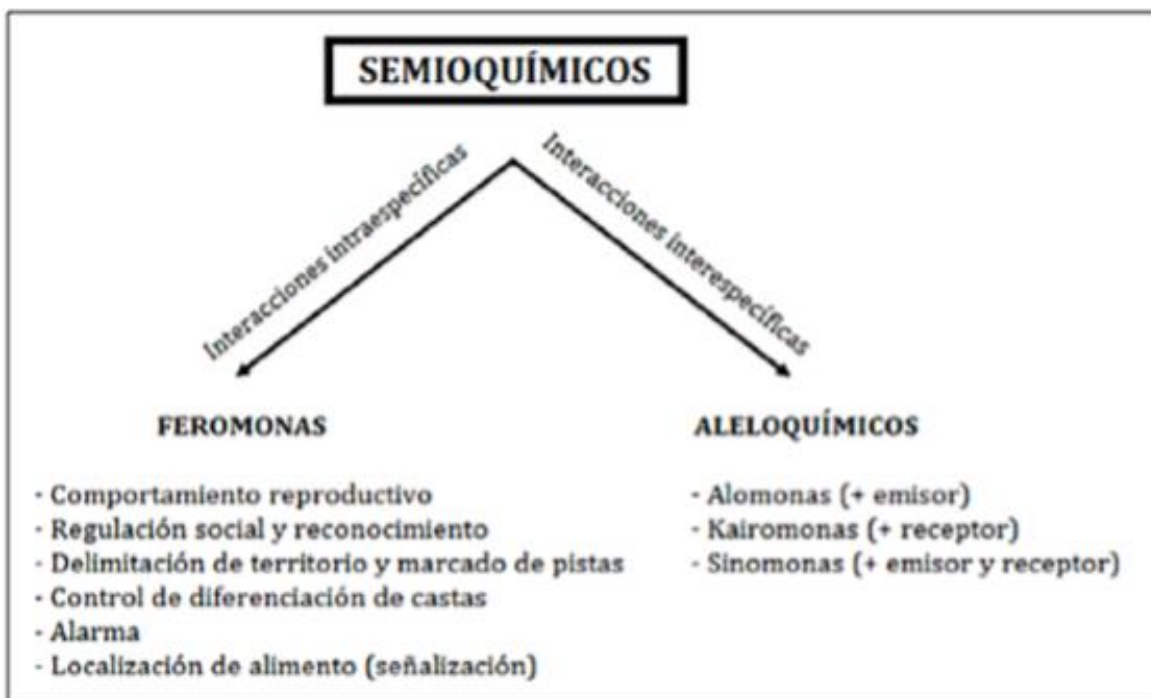


Figura 14.- Clasificación de semioquímicos (Cortez, 2013).

Los semioquímicos son compuestos que se sintetizan a partir de rutas degradativas del metabolismo primario y sin tener un rol específico en éste. En la biosíntesis intervienen cientos de miles de enzimas especializadas y en la mayoría de los casos es un sustrato y una enzima para un compuesto. Sin embargo, puede ocurrir la síntesis de muchos productos por una sola enzima a partir de varios precursores o menos frecuentemente de un solo sustrato.

Esta red de síntesis da origen a muchos compuestos y rutas metabólicas nuevas, que dan lugar a una diversidad química que desempeña un rol importante en la historia evolutiva de las especies.

Muchas especies de insectos transmiten enfermedades al hombre o a los animales de producción, por lo que el estudio de procesos de comunicación química en insectos posee potencial en el desarrollo de métodos de manejo de insectos perjudiciales.

## 4. Antecedentes

### 4.1 Flavivirus, el virus del dengue.

Entre los Flavivirus más virulentos se encuentran el virus de fiebre amarilla, el virus del Dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4), el virus de encefalitis japonesa y el virus del Nilo occidental.

El virus del Dengue se extiende por 100 países, y más de 2,5 millones de personas viven en zonas donde el Dengue es endémico. En casi la misma manera, el virus de fiebre amarilla afecta a más de 200.000 personas al año, con una tasa de mortalidad de alrededor del 20% (Junglen et al., 2009).

Se encuentra en casi cien países tropicales y se calcula que 2,5 billones de personas habitan en áreas donde existe el riesgo de transmisión (Cabezas, 2005).

Un vector artrópodo se infecta con el virus después de picar un huésped vertebrado infectado, si el título del virus en la sangre del huésped es lo suficientemente alta puede transmitir el virus (Velandia y Castellanos 2011).

Según Chotiwan *et al.* (2018) la replicación viral exitosa está muy influenciada por el entorno bioquímico de la célula o tejido huésped y los Flavivirus reorganizan este entorno para beneficiar sus necesidades.

El dengue está conformado por una membrana lipídica que es obtenida de las células del huésped, sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura. (Velandia y Castellanos 2011).

Los metabolitos derivados de células hospederas como lípidos, azúcares y aminoácidos se utilizan para producir progenie viral, ayudar a evadir el sistema inmune del huésped y permitir la finalización exitosa del ciclo de vida.

La importancia funcional de la proteína E que es la proteína de envoltura del virus del dengue, radica en que es la única proteína viral que interactúa con las moléculas

receptoras de la membrana plasmática de las células vulnerables que favorecen la endocitosis del virus.

Por lo tanto, las mutaciones y modificaciones posteriores a la transducción que sufre esta proteína en cada ciclo de replicación, pueden afectar directamente la eficiencia de la replicación, la virulencia y el tropismo del DENV, al igual que puede regular el establecimiento y el control de la infección por parte del sistema inmunitario (Velandia y Castellanos, 2011).

## 4.2 La cutícula, importancia de los lípidos.

Los lípidos en la cutícula de los insectos son de gran importancia, ya que ésta tiene función de soporte para los músculos y otras estructuras como alas, glándulas, pelos, tracto digestivo. Sirve como cubierta para la protección de órganos internos, tales como tubos traqueales, conductos glandulares y el estomodeo y proctodeo del sistema digestivo.

Confiere protección mecánica, química y biológica a los tejidos vivos del medio externo, restringe la pérdida de agua, refleja la luz, confiere coloración y tiene función en el reconocimiento ínter y extra específico (Page *et al.*, 1990; Bidochka & Khachatourians, 1997; Gullan & Cranston, 1998; Muratori *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2007).

La cutícula está recubierta con compuestos químicos que tienen, sobre todo, dos funciones primordiales. El primero es realizar la impermeabilización, y el segundo es realizar la comunicación química (Blomquist y Bagnères, 2010).

La cutícula es una estructura extracelular estratificada secretada por la epidermis, que recubre toda la superficie del cuerpo del animal actuando como exoesqueleto y como tegumento protector.

Estudios de microscopía óptica han permitido determinar la existencia de dos grandes divisiones estructurales: una capa externa delgada y amorfa denominada epicutícula, y una capa interna mucho más gruesa llamada procutícula (Wigglesworth, 1939).



Las tres especies lipídicas principales de la cutícula de este insecto son, hidrocarburos, alcoholes grasos y ácidos grasos libres o esterificados (Juárez y Brenner 1989, Juárez 1995, Juárez et al. 1996).

La entrada de los virus (envueltos) a las células implica la unión a receptores y fusión de la membrana viral con la membrana celular. Ambos procesos son controlados por las glicoproteínas de la superficie viral.

Las proteínas que median la fusión poseen elementos estructurales que interactúan con los lípidos en la membrana diana, y en algunos casos, lípidos específicos han participado en estos procesos.

El crecimiento viral se produce a través de la formación de complejos de replicación viral (VRC), que consiste en vesículas lipídicas construidas por todos los virus de ARN de cadena positiva de la reorganización de las membranas intracelulares del huésped; Dentro de esta vesícula, se produce el ensamblaje viral.

La naturaleza y especificidad de estas interacciones proteína-lípido son menos conocidas que la interacción producida al unirse la proteína a su receptor (Stiasny, 2003).

#### 4.2.1 Hidrocarburos cuticulares en insectos

Los hidrocarburos (HC) son constituyentes característicos de los lípidos cuticulares de insectos (Blomquist et al. 1972, Soliday et al. 1974, Blomquist y Jackson 1979, Lockey 1980, 20 Warthen y Uebel 1980, Howard y Blomquist 1982, Blomquist y Dillwith 1985, Lockey 1985a, Blomquist et al. 1987, Lockey 1988).

Los hidrocarburos cuticulares constituyen la capa cerosa de la epicutícula de los insectos, cumplen la función de evitar la deshidratación y funcionan como señales de reconocimiento inter e intraespecífico (Peralta, 2018).

Algunos ejemplos en estudios de hidrocarburos cuticulares en insectos son:

Un estudio sobre la biosíntesis de ácidos grasos ramificados con metilo en *Triatoma infestans* por Juárez *et al.* 1996 mostró que la actividad de ácido graso sintetasa (FAS) se encontró en las fracciones microsomal y citosólica del huevo de los hemíptera *Triatoma infestans*. Los principales ácidos grasos son los ácidos oleico y palmítico.



**Figura 15.-** Fotografía de *Triatoma infestans* (CONABIO, 2012).

Blomquist *et al.*, 1993 mostró la regulación de la comunicación química con la expresión de hidrocarburos en diferentes especies de insectos una de éstas es *Blattella germanica* donde a través de su estudio en feromonas sexuales derivadas de hidrocarburos en insectos: bioquímica y regulación endocrina, se estableció que algunos ácidos grasos y lípidos en general están involucrados en la generación de hormonas sexuales de dicha especie, tales como; el ácido oléico, ácido eicosenoico, ácido erúcico, esfingomielinas, glucosilceramidas, y glicerofosfolinas.



**Figura 16.-** Fotografía de *Blattella germanica* (Duran, 2016).

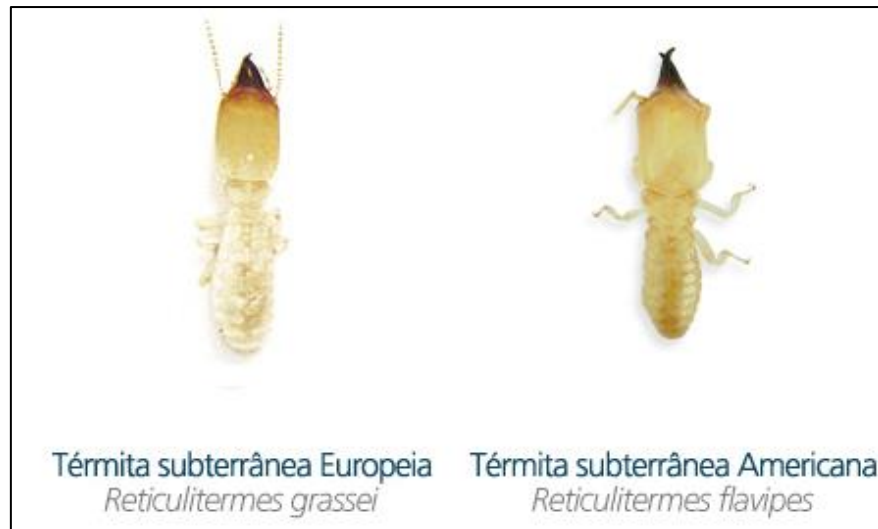
Brossette *et al*, 2018, realizó un análisis sobre señalización química general de dos especies de termitas *Reticulitermes grassei* (Clément, 1978) y *Reticulitermes flavipes* (Kollar, 1837), donde probaron si la presencia de un olor a depredador (hormigas) afectaba los índices de casta, los índices de mortalidad, la agresividad y los perfiles de CHC (hidrocarburos cuticulares).

Como resultado de dicho experimento en *R. grassei*, la exposición prolongada al olor de depredadores influyó en las tasas de supervivencia y en los perfiles químicos modificados. Curiosamente, no fue el caso de la especie invasora *R. flavipes*.

Existe algo en este estudio que particularmente se debe mencionar y es la “transferencia química”.

Cuando se menciona que con respecto a los compuestos que comparten la hormiga y las termitas, en un caso hipotético; si se hubiera producido una transferencia química, entonces la heterogeneidad química debería haber aumentado en los grupos expuestos al olor del depredador en ambas especies.

En publicaciones anteriores mostraron que los CHC exógenos externos se transfirieron al primer contacto, pero no se incorporaron a los perfiles cuticulares durante varios días (Meskali *et al* ., 1995 ; Sevala *et al* ., 2000 ; Soroker *et al* ., 2003).



**Figura 17.-** *Reticulitermes grassei* y *Reticulitermes flavipes* (Ratamur, 2012).

Rogoff y otros (1964), Mayer y James (1971) demostraron en un estudio de lípidos en *Musca Domestica* que la fracción lipídica no polar de las heces de era atractiva para las moscas domésticas masculinas.

Silhacek *et al*, 1972, demostró que los extractos de hembras vírgenes de *Musca Domestica* componentes activos, también encontrados en los cuerpos de las moscas, fueron identificados como hidrocarburos los cuales resultaron atractivos para los machos, mientras que los extractos vírgenes masculinos no lo fueron lo que indica que estas sustancias actúan como feromonas sexuales.

Finalmente, Carlson y otros (1971) utilizaron tanto el fraccionamiento como los hidrocarburos sintéticos para demostrar que (Z) -9-tricoseno, el principal compuesto encontrado en la cutícula femenina de *Musca Domestica*, era una feromona sexual para las moscas domésticas masculinas. Los autores mencionan también que este modelo ha llegado a dominar la comprensión de la comunicación química en Díptera, en particular las señales involucradas en el cortejo y el apareamiento.

No obstante, argumentaron también que parece ser que la mayoría de las especies de dípteros no se ajustan al modelo de *Musca Domestica* y que muchas especies solo expresan una variación cuantitativa para los compuestos compartidos por ambos

sexos (Bartelt y otros, 1986; Jallon y David, 1987; Toolson y Kuper-Simbron, 1989; Byrne y otros, 1995), mientras que en otras especies los adultos de ambos sexos parecen ser prácticamente idénticos (Stoffolano *et al*, 1997; Howard *et al*, 2003).



**Figura 18.-** *Musca Domestica* ( 2019, Recuperado de: <https://www.dondevive.org/moscas/>)

Dwecka *et al*, 2015, señala que en la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, los hidrocarburos cuticulares (CHC) actúan como feromonas y desempeñan un papel importante en el comportamiento, para la obtención de resultados utilizaron TD-GC-MS (espectrometría de masas por cromatografía de gases de absorción) para medir los perfiles de CHC de moscas individuales.

Encontraron que en las neuronas sensoriales olfativas (OSN) que expresan Or47b (Receptor odorante 47b) y Or88a (Receptor odorante 88a) se detectaron tres odorantes producidos por la mosca, laurato de metilo (ML), miristato de metilo y palmitato de metilo.

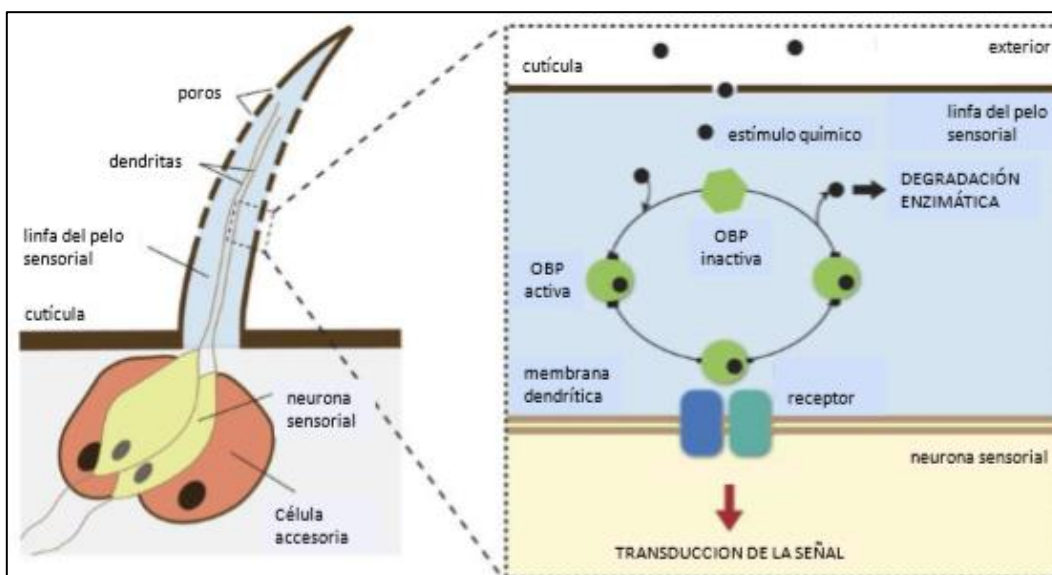
Las OSN que expresan Or47b son necesarios para un comportamiento óptimo de la cópula masculina. Además, la activación de OSN que expresan Or47b en el macho es suficiente para proporcionar una ventaja de apareamiento competitiva.



**Figura 19.-** *Drosophila melanogaster* (Goetgheluck, 2018).

Los HC son importantes debido a que intervienen en procesos de comunicación entre los insectos al utilizarse como señales de reconocimiento inter e intraespecífico según Howard y Blomquist (2005), con ello identifican a sus depredadores o a sus aliados (Howard 1993, Smith y Breed 1995).

Aunque existen estructuras quimiorreceptoras en diversas partes del cuerpo de los insectos, las antenas son los órganos olfativos por excelencia. (Sellanes, 2011).



**Figura 20.-** Esquema de un pelo sensorial de la antena de un insecto (Sellanes, 2011).

### 4.3 Estudios de composición de química lipídica.

En un estudio realizado en la Universidad de Viçosa, Brasil por Soto, 2011; se analizó la composición química de la cutícula de dos ácaros, *Tetranychus urticae* y *Tetranychus evansi* para analizar la ecología química intra e interespecífica. Los ácaros fueron pesados y posteriormente fueron sometidos a la extracción, utilizando una suficiente cantidad de solvente, hexano o cloroformo, para cubrirlos.

Se realizó un análisis cromatográfico basado en una Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CGMS), como resultado del trabajo se describe la predominancia de compuestos polares en la cutícula.

Se evaluaron los compuestos que estaban presentes en concentración total relativa, presencia diferencial y la polaridad de los compuestos, de los cuales los más abundantes resultaron ser:

- a) Ácido palmítico o ácido hexadecanoico.
- b) Ácido linoleico o ácido 9,12-octadecadienoico.
- c) Ácido esteárico o ácido octadecanoico.
- d) Metil linoleato o ácido 9,12,15-octadecatrienoico-metil ester.

Evaluando de ésta manera la diferenciación de la constitución química, de la cutícula de ambos ácaros donde, *T. urticae* obtuvo mayor concentración de dichos compuestos con respecto a *T. evansi*.

Se mencionó a su vez que el hexano es el solvente más comúnmente utilizado en la literatura para extracción de los compuestos cuticulares de artrópodos (Nelson *et al.*, 1988; Anyanwu *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001; Horne & Priestman, 2002).

El cloroformo, hexano y heptano, son tres solventes lipídicos que se usan tradicionalmente para extraer los lípidos de la superficie de los insectos [Wang, Y., Yu, Z., Zhang, J. y Moussian, B., 2016]).

Perera R, - *et al.* (2012), en un estudio realizado para la revista PLoS Pathog titulado Infección por virus dengue, perturbación de la homeostasis de lípidos en las células de mosquitos infectados en la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus*; señala que la capacidad de sintetizar los lípidos predispone a un organismo a funcionar como hospedero de los agentes infecciosos que carecen de este rasgo.

Por ello la identificación de estos cambios en los lípidos que ocurren durante la infección es un primer paso necesario para descubrir cómo el DENV y sus proteínas modifican el metabolismo de los lípidos de las células.

El estudio se llevó a cabo mediante una espectrometría de masas de alta resolución de las células de mosquito, demostrando que la remodelación de la membrana está directamente relacionada con un repertorio de lípidos único inducido por la infección por el virus del dengue.

En una publicación de la revista PLoS Pathog realizada por Chotiwan N, - *et al.* (2018), se expresa que la remodelación dinámica de los lípidos coincide con la replicación del virus del dengue (DENV2) en el intestino medio de los mosquitos en este caso la especie de estudio fue *Aedes aegypti*.

Por medio de espectrometría de masas de alta resolución se evaluaron las perturbaciones metabólicas temporales que ocurren después de la infección por el virus del dengue en el tejido del intestino medio del organismo, y en los resultados de dicho trabajo se observó un aumento en el contenido de lípidos, en particular los glicerofosfolípidos, esfingolípidos y ácidos grasos; dicho aumento se produce a la par de la replicación viral.

Este estudio destaca que se localizaron puntos de estrangulamiento bioquímicos que podrían dirigirse a interrumpir la transmisión de múltiples patógenos por estos mosquitos y así reducir la transmisión a los humanos.



Melo, C., et al 2018, realizó un estudio donde el objetivo se centró en verificar los cambios en el lipidoma sérico de pacientes infectados con DENV-4, esto debido al papel de los lípidos en la importancia viral.

La diferencia entre éste y otros estudios similares es el análisis que se presentó, la mayoría de ellos se realiza mediante cromatografía líquida acoplada a técnicas de espectrometría de masas (LC-MS), mientras que el presente estudio se empleó la espectrometría de masas de infusión directa de alta resolución, lo cual ayudó a tener resultados más precisos debido a su baja manipulación.

La importancia de los cambios de lípidos durante la infección de las células DENV es evidente cuando el virus asume el control del metabolismo celular al controlar y regular los mecanismos de autofagia para satisfacer las necesidades de la replicación viral.

Dado que DENV controla el metabolismo lipídico de la célula huésped, y existe una necesidad de una demanda bioenergética adicional en el proceso de replicación viral, en los resultados del estudio el virus promovió la movilización y el reclutamiento de gotitas de lípidos responsables del stock celular de Triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol.

Los TG reclutados se someten a la acción de las lipasas para proporcionar los ácidos grasos (FA) necesarios para el suministro de energía adicional, ya que estos TG se utilizan para la producción de ATP a través de la vía de oxidación  $\beta$ , esto quiere decir que una mayor demanda bioenergética de replicación viral conduce a un mayor reclutamiento de TG como fuente de energía.

Se encontraron también tres Fosfatidilcolina (PC) identificadas como moléculas características para el grupo de pacientes infectados relacionadas con el conjunto de PC sintetizadas por las células infectadas para la replicación viral.

Zhang, Jiantao, *et al*, 2016 demostraron que un aumento significativo de la Fosfatidilcolina (PC) se asocia con la replicación viral y se produce principalmente en la membrana perinuclear del retículo endoplásmico (RE), donde ocurre la replicación viral. Una característica altamente conservada e indispensable de la infección por el virus (+) ARN es que estos virus proliferan y reorganizan las membranas del huésped para ensamblar complejos de replicación viral (VRC).

Mostraron que el virus del mosaico bromo (BMV) estimula la síntesis de Fosfatidilcolina (PC) en los sitios de replicación viral. Debido a que BMV recluta una enzima huésped involucrada en la síntesis de PC para apoyar la formación adecuada de VRC y la replicación genómica. Así mismo también demostraron que el virus de la hepatitis C y el poliovirus también promueven la acumulación de PC en los sitios de replicación viral, revelando una característica común a un grupo de virus (+) ARN.

Sus datos mostraron que la acumulación de PC se debe a la formación de esta clase de lípidos en la región donde permanecerá el Complejo de replicación viral (VRC), y no se debe al transporte de PC preexistente en el interior celular.

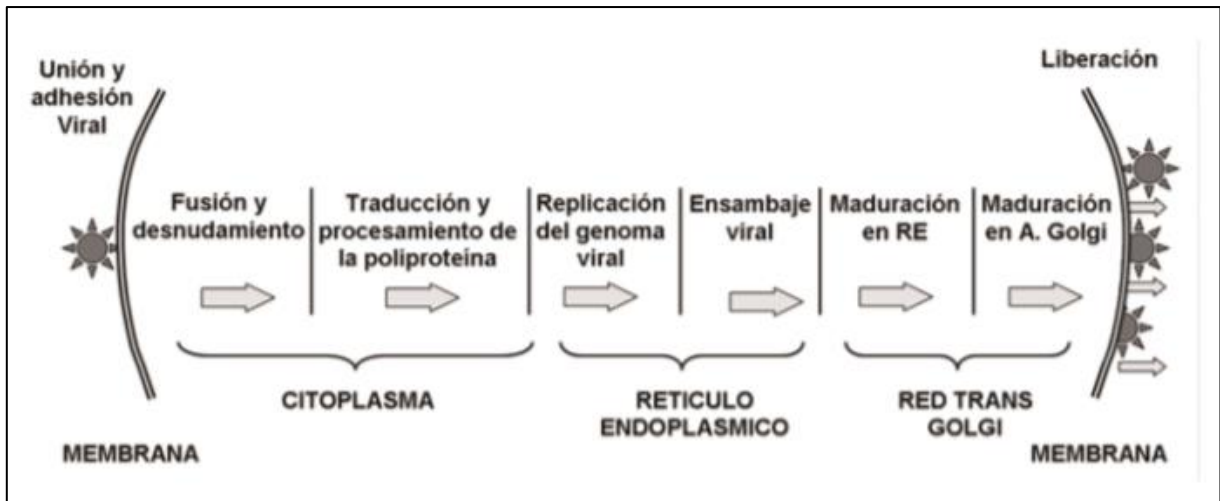
En la siguiente tabla se muestran los lípidos específicos requeridos para la replicación del virus del dengue y los estudios donde se confirma dicho supuesto.

Especies lipídicas específicas requeridas por diferentes virus (+) RNA para la replicación exitosa del genoma.						
Familia	Género	Especie	Lípidos requeridos	Sitios de replicación viral	Lípidos de enriquecimiento	Referencias
<b>Flaviviridae</b>	<i>Flavivirus</i>	Virus Dengue	PC, Esterol, FA	Membrana ER	FA	Rothwell et al., 2009; Heaton and Randall, 2010; Heaton et al., 2010; Perera et al., 2012; Zhang J. et al., 2018.

**Tabla 3.-** Especies lipídicas específicas requeridas por diferentes virus (+) RNA para la replicación exitosa del genoma (Modificada de Zhang, Z., *et al* 2019).

#### 4.4 Interacción virus dengue-vector

El proceso de infección se inicia con el acercamiento del DENV a la superficie de la célula del mosquito; posteriormente, la proteína E interactúa con proteínas o proteoglicanos de la membrana celular que median la unión y la posterior endocitosis del virus (Velandia, 2011).



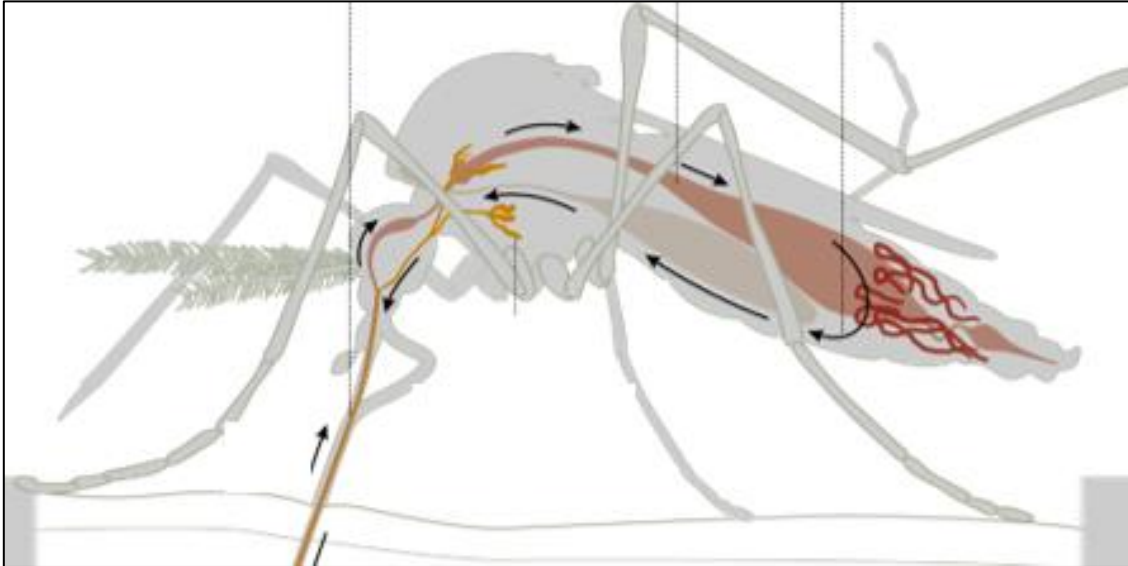
**Figura 21.-** Diagrama del ciclo viral intracelular del virus del dengue y la localización subcelular de cada uno de los eventos (Velandia, 2011).

La glucoproteína E es el principal inmunógeno del virus, por lo tanto, estimula la respuesta inmune del individuo e induce la producción de anticuerpos neutralizadores. (Velandia, 2011).

La permisividad intrínseca de *Aedes aegypti* a la infección, replicación y transmisión del virus se centra en primera instancia en pasar una serie de barreras frente a la infección tales como:

- La barrera de entrada al intestino medio
- La barrera de salida del intestino medio
- La barrera de las glándulas salivales

La actividad de la circulación del virus dengue en *Aedes aegypti* comienza con la ingesta de sangre de una persona infectada por el mosquito seguida de el paso de esta sangre al intestino medio, posteriormente el virus entra a la hemolinfa y de ahí pasa a las glándulas salivales para finalmente poder infectar a otra persona a través de la saliva. (Almukhtar, 2016).



**Figura 22.-** Circulación del virus del dengue en *Aedes aegypti* (Almukhtar, 2016).

Para comprobar que la infección sea certera resulta más factible la aplicación de técnicas de biología molecular para la detección del genoma viral. Se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar el serotipo viral y también la carga viral, en este caso utilizando el llamado PCR en tiempo real (Guzmán & Kourí, 2004).

## 5. Justificación

Debido a su gran capacidad de adaptación, los insectos han tenido un gran éxito evolutivo lo cual nos lleva a evaluar una de las características morfológicas más destacadas para los artrópodos; su cutícula.

Así mismo siendo los artrópodos el grupo que representa mayor número de vectores de enfermedades entre ellas el dengue causado por el virus del dengue, siendo la principal enfermedad transmitida por artrópodos en el mundo; es preciso evaluar si existe una reorganización lipídica para el vector.

Esto nos permitirá observar las diferencias en la composición del lipidoma cuticular de *Aedes aegypti* del grupo infectado con DENV2 respecto al grupo control (no infectados) tomando en cuenta que los lípidos son esenciales para la replicación de los genomas virales.

## 6. Hipótesis

- 1.- La composición lipídica de la cutícula de *Aedes aegypti* será diferente en moscos infectados respecto a los no infectados.
- 2.- El virus dengue serotipo 2 (DENV2) originará cambios cuantificables en el repertorio lipídico de la cutícula de *Aedes aegypti*.
- 3.- El resultado del perfil del lipidoma de la cutícula de *Aedes aegypti* del grupo infectado con DENV2 será distinto respecto al grupo de los moscos no infectados.

## **7. Objetivo general**

1.- Determinar la composición de lípidos en la cutícula de moscos *Aedes aegypti* infectados y no infectados con DENV2.

## **8. Objetivos particulares**

1.- Evaluar posibles cambios en la composición de lípidos en la cutícula de *Aedes aegypti* durante la infección con DENV2.

1.1.- Mediante la comprobación de los individuos infectados con el análisis de extracción del RNA de las excretas de los mosquitos.

2.- Cuantificar el perfil lipídico en la cutícula de ambos grupos de estudio de *Aedes aegypti*.

2.1.- A través de los resultados por medio del análisis por espectrometría de masas.

## **9. Materiales y métodos**

### **9.1 La crianza**

La crianza de *Aedes aegypti*, se llevó a cabo en las instalaciones del insectario en el Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Mor, se colocaron huevos de mosquitos *Aedes aegypti* cepa Rockefeller en 500 ml de agua previamente hervida, para de esta manera disminuir las condiciones oxigénicas, una vez emergidas las larvas se colocaron 200 individuos por palangana, 1800 individuos en total y se mantuvieron en el insectario, a una temperatura de 28°C con una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 12/12 luz-oscuridad.

## 9.2 Alimentación

La alimentación se realizó en base a una dieta comprendida por extracto de levadura, lacto albúmina hidrolizada (25 gr de lacto albúmina para 1L. de agua), y comida para ratón; en proporción 1:1:1 (500 gr de cada ingrediente), se mezclaron y de este preparado se separaron 25gr que se agregaron posteriormente a 200 ml de agua.

La cantidad de alimento por palangana se realizó en base a una tabla de seguimiento para alimentación de larvas y crisálidas establecida por protocolos de alimentación del Insectario II del INSP la cual se encuentra en el anexo 1.

La alimentación de los adultos se basó en solución azucarada al 10% durante los primeros cuatro días, almacenada en el refrigerador del insectario a 20°C, llegado el quinto día se hizo una pausa para pasar a la alimentación con sangre (día de la infección).

Para la separación de las pupas se eligieron de las palanganas los individuos que marcaron el estadio y se colocaron cerca de 150 pupas para la emergencia de los adultos en botes de plástico con las tapas de malla delgada para permitir su posterior alimentación, obteniendo de esta manera cerca de cuatro botes de recolección de pupas para realizar la infección y cerciorarnos de la proporción de hembras que se requieran para los ensayos experimentales.



### 9.3 Infección

La alimentación sanguínea se hizo con ayuda de un baño circulatorio a 37°C, y alimentadores artificiales, colocando las mangueras en el baño y en los alimentadores para que en cada uno de ellos mantuviera la sangre a esa temperatura, posteriormente se colocó la sangre de conejo requerida para la alimentación en los alimentadores artificiales dispuestos para el grupo experimental con DENV2 en proporción 1:1 (1 ml de sangre por 1 ml de DENV2).

Para el grupo control se empleó la misma temperatura en el baño circulatorio, utilizando distintos alimentadores y alimentando únicamente con sangre de conejo (1 ml).

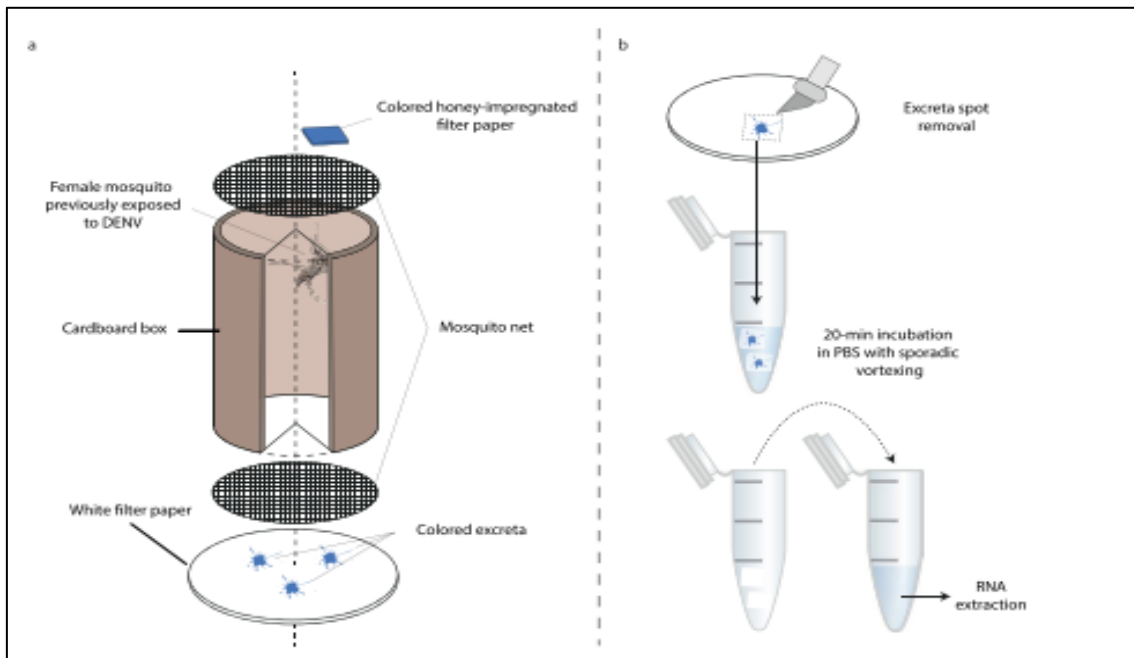
Cabe aclarar que para la realización de la infección del grupo experimental y la alimentación del grupo control se manejaron alimentadores previamente esterilizados en la zona de autoclave y que durante la alimentación los mosquitos permanecieron en las condiciones óptimas de luz y temperatura requeridas.

### 9.4 Protocolo de monitoreo no destructivo del virus dengue en las excretas de *Aedes aegypti*.

El análisis en el que está basado la comprobación de la infección con DENV2 de los mosquitos *Aedes aegypti* es un protocolo de monitoreo de la excreción del ARN del virus del dengue, en el trabajo se muestra que la detección de ARN de DENV en la excreta de mosquitos individuales se correlaciona con la diseminación viral sistémica.

El método se basa en la observación de los mosquitos que producen excretas de color cuando se mantienen con acceso a una solución de miel mezclada con un colorante alimentario. Las manchas de las excretas se visualizan fácilmente en un papel de filtro blanco los cuales están colocados debajo de una caja de cartón en la que se mantienen los mosquitos, y se pueden recolectar para pruebas posteriores como se muestra en

la figura 23. Los mosquitos no producen excretas de color en ausencia de colorante en la solución de miel.



**Figura 23.-** Esquema del método utilizado para recolectar excrementos de mosquitos. Fontaine, A. *et al.* (2016).

## 9.5 Post-infección

Se procedió a separar las hembras alimentadas con sangre mediante apreciación visual del abdomen, las que ingirieron sangre se colocaron individualmente (50 hembras del grupo experimental y 50 hembras del grupo control) en vasos desechables de poliestireno termo conformado con una ranura protegida en el fondo, la cual permitirá colocar y retirar el papel filtro (rotulados por número de individuo) donde posteriormente depositaron sus excretas.

El filtró se colocó a los 5 Días Post Infección (DPI) y se retiró al 7DPI para evitar así las excretas pertenecientes al bolo alimenticio, durante estos días post-infección los individuos fueron alimentados únicamente con algodones humedecidos con solución

al 4% de colorante, 10% miel de abeja misma que se almacenó en el refrigerador de 20°C perteneciente al Insectario.

Los algodones fueron cambiados diariamente para evitar así la retención de hongos y bacterias, las excretas recuperadas de los individuos se recortaron y almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml con Tampón Fosfato Salino (PBS) al 1X individualmente para proceder al análisis de extracción de Extracción de RNA<sub>TOTAL</sub> que fue el primer paso para poder evaluar la diseminación viral sistémica.

## 9.6 Procedimiento de conservación de cutícula

Los individuos del grupo control y experimental que se encuentran en sus vasos individuales se llevaron al congelador de -20°C durante 1 minuto aproximadamente, posteriormente se colocaron en hielo, a cada mosquito se le retiraron las patas y las alas y seguido de esto se pesaron uno a uno en la balanza analítica.

Después de ser pesados se colocaron en tubos de cristal de 1.5 ml suspendidos en 10 µL de hexano, se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente para su posterior análisis de espectrometría de masas.

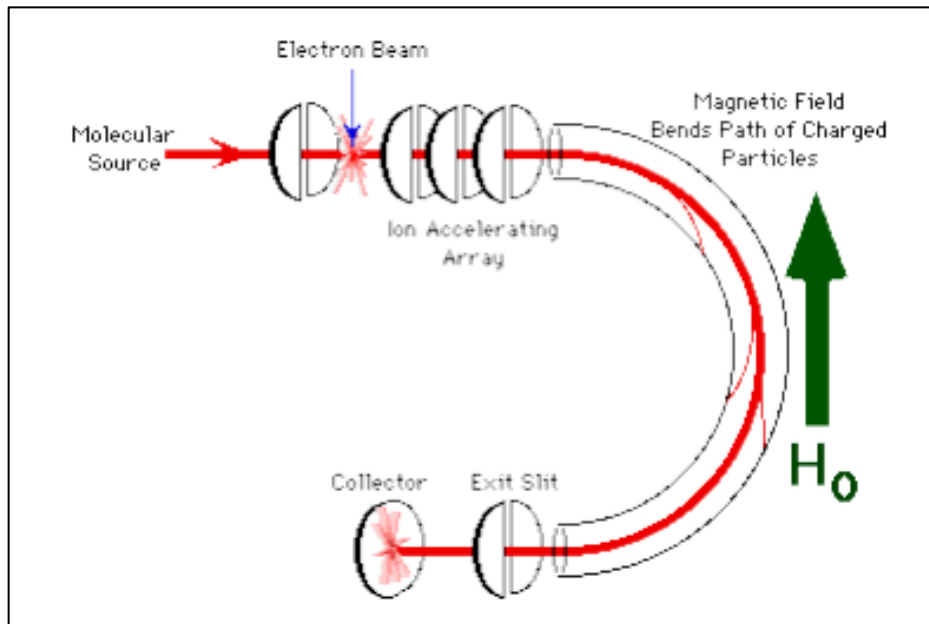
## 9.7 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una herramienta espectroscópica analítica enfocada principalmente a la separación de especies moleculares y atómicas de acuerdo a su masa. La espectrometría de masas puede ser usada para el análisis de muchos tipos de muestras, desde unidades elementales hasta grandes proteínas y polímeros. La observación de picos comunes en un espectro puede proporcionar información útil respecto a grupos funcionales. (Hoffmann, 2001).

Los elementos que componen un espectrómetro de masas son los siguientes:

- Un sistema de inyección
- Una fuente de iones
- Un analizador de masa
- Un detector

Las muestras pueden ser introducidas directamente a la fuente de iones del espectrómetro en una sonda, o en el caso de mezclas, por un sistema intermediario (ej. Cromatógrafo de Gases, Cromatógrafo de Líquidos, Electroforesis capilar, etc.). Una vez que la muestra se encuentra en la fuente de iones, las moléculas de la muestra se someten a ionización; para ello la sustancia es bombardeada con un rayo de electrones que tienen suficiente energía para romper la molécula. Los fragmentos positivos que se producen (cationes y cationes radicales) se aceleran en vacío a través de un campo magnético y son distribuidos en base a su relación carga/masa ( $m/z$ ). Dado que la mayor parte de los iones producidos en el espectrómetro de masas conllevan una carga positiva, el valor de la relación  $m/z$  es equivalente al peso molecular del fragmento. El análisis de la información del espectro de masas requiere reagrupar teóricamente los fragmentos para reconstruir la molécula original. (Hoffmann, 2001).



**Figura 24.-** Esquema general del mecanismo de desviación de iones de fragmentos mediante un imán en un espectrómetro de masas. (Hoffmann, 2001).

La información que arroja el espectrómetro de masas es una gráfica de intensidad relativa vs. la relación carga/masa. El pico más intenso en el espectro se llama “pico base” y todos los demás se reportan en relación a la intensidad de este.

Los picos son extremadamente delgados y comúnmente aparecen como líneas verticales. (Hoffmann, 2001).

## 9.8 Análisis de las excretas

### Extracción de RNA<sub>TOTAL</sub>

Para comenzar el análisis de las excretas de los mosquitos *Aedes aegypti* a cada muestra se le agregó 100 µL de buffer AVL Viral Lysis (Quiagen), posteriormente se incubó a 56°C durante 20 minutos y se vortexearon las muestras cada 10 minutos durante un minuto. Se centrifugaron las muestras rápidamente para recuperar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 µL donde se recuperaron aproximadamente 250 µL de sobrenadante y se agregó a cada muestra 500 µL de trizol se añadió 200 µL de cloroformo y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos; posteriormente se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó aproximadamente 250 µL del sobrenadante al cual se agregó 500 µL de isopropanol, se dejó en hielo 10 min o -20°C tiempo infinito. Se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante para recuperar la pastilla o pellet, se agregó 500 µL de etanol al 75% y se centrifugó a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C seguido de esto se retiró el sobrenadante y se dejó secar durante 5-10 minutos boca abajo en un papel filtro, posteriormente se colocaron los tubos eppendorf a 55°C en el termoblock con la tapa abierta durante 10 minutos. Se resuspendieron las muestras en 20 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y se almacenaron las muestras a -70°C y se realizó la cuantificación de las muestras en el nanodrop.

\*La relación de RNA con respecto al individuo se puede observar en el anexo II.

Con el material genético obtenido, se llevó a cabo un RT-PCR usando:

The Invitrogen™ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System, bajo la siguiente mezcla de reacción:

Concentración x12

Activos	X1	X12
Reaction Mix	5 µL	60 µL
RNA <sub>TOTAL</sub> >10 ng	1 µL	12 µL (Individual)
Oligo FW	0.5 µL	6 µL
Oligo RV	0.5 µL	6 µL
SSIII	0.25 µL	3 µL
MgSO <sub>4</sub> 5Mm	0.15 µL	1.8 µL
H <sub>2</sub> O SyBR	2.6 µL	31.2 µL
Volumen total	10 µL	108/12=9 µL x/c tubo

**Tabla 4.-** Concentraciones para llevar a cabo un RT-PCR usando la enzima Superscript III One-Step RT-PCR System.

Para fines prácticos se realizó un Master mix y se dividió entre 12 (10 muestras experimentales y 2 controles).

Posteriormente de la realización de la concentración de las 12 muestras, se tomaron 9 µL para cada tubo y al final se colocó RNA a cada tubo con puntas distintas.

Una vez hecho esto, se llevaron las muestras a la micro-centrífuga y posteriormente al termociclador T100 Thermal Cycler for PCR de BIO-RAD bajo condiciones detalladas en la tabla 4; 2:25 horas después las muestras se retiraron y se corrió en un gel de agarosa.

Condiciones	
Temperatura	Tiempo
45° C	35:00
94° C	2:00
95° C	0:30
60° C	0:30
72° C	1:00
GOTO	35x
72° C	5:00

**Tabla 5.-** Protocolo en tiempo de RT-Dengue en el termociclador.

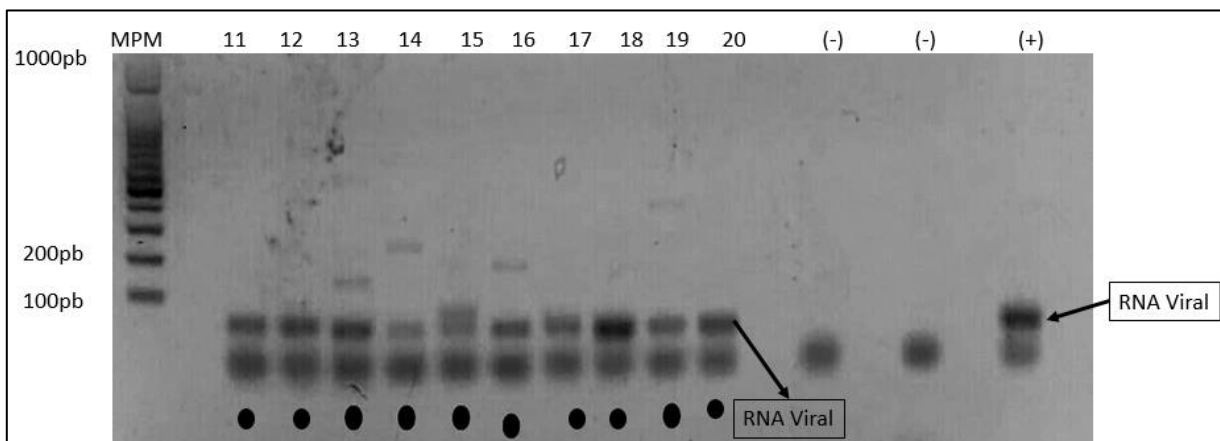
A cada una de las muestras se colocaron 2  $\mu$ L de Buffer de carga para cargar la muestra a un gel de agarosa al 1.2%. Las bandas resultantes en los geles de agarosa si son positivos, deben estar entre los 80 pares de bases (pb) debido a que es el tamaño del fragmento amplificado de la proteína de la cápside del DENV.

Los geles se tiñeron con gel red, protocolo en el anexo III.



## 10. Resultados

De los resultados, observamos que el grupo experimental obtuvo un porcentaje de infectados que superó el 50 % de los individuos con 27 infectados de un total de 50 expuestos al virus, el análisis de extracción de ARN de las excretas realizado nos permitió comprobar cuales individuos estaban infectados en un gel de agarosa tal y como se muestra en la figura 25, como producto final.



**Figura 25.-** Gel de agarosa, análisis de comprobación de infección con DENV2 de las muestras individuales del grupo experimental, individuos del 11 al 20.

La lista de las muestras que contienen los resultados de las infecciones a las cuales se les realizó la espectrometría de masas se encuentra en el anexo IV.

La espectrometría de masas realizada por el Dr. Massimo Massei del Departamento de Ciencias de la vida y Sistemas Biológicos de la Universidad de Turín en Italia, obtuvo como resultados los valores que se muestran a continuación, en la tabla 6 se muestran los ácidos grasos presentes en el grupo experimental y en la figura 26 un gráfico de comparación de la abundancia relativa de los iones de ácidos grasos entre los individuos del grupo experimental, en la tabla 7 los ácidos grasos presentes para

el grupo control y en la figura 27 la abundancia relativa de los iones de ácidos grasos entre individuos del grupo control.

Sample	Decane	C14:0	C16:1	C16:0	C18:1	C18:0	TOTAL
E2	.	.	533543	39127	42270	47016	661956
E11	.	.	82413	121381	.	.	203794
E12	609954	4109103	396486	410571	.	65025	5591139
E13	969643	4534032	138270	50872	.	.	5692817
E15	511623	3420730	.	.	.	38214	3970567
E16	36003	3949076	582304	84746	.	.	4652129
E17	35836	3939924	334814	347613	.	.	4658187
E18	817765	5100532	432170	324820	.	.	6675287
E14	744863	5247503	685854	476314	188170	.	7342704
E19	768621	4879174	784948	727901	138728	.	7299372
E20	600839	3876985	336713	414357	.	.	5228894
E22	544300	3814554	186382	246432	.	.	4791668
E26	733444	4716075	844343	.	45614	.	6339476
E27	627940	3751912	1117682	863211	56.47	63021	6423822
E28	619788	4506079	311552	45349	.	60227	5542995
E29	685869	4376939	43848	67272	.	57211	5231139
E33	477094	2734492	1046405	1415593	475628	53533	6202745
E39	474745	2692918	1225981	1060768	679813	81566	6215791
E40	534435	3692587	553438	691503	93601	35104	5600668
E41	578548	3628538	931242	1097050	298083	.	6533461
E42	557548	3570938	2568501	1490006	1849518	254154	10290665
E43	555173	3514028	490663	612633	82900	.	5255397
E45	599314	4163407	963667	932373	382030	.	7040791
E46	549616	3480439	193521	211306	88062	260822	4783766
E47	585632	4097606	69122	.	.	.	4752360
E50	558401	4018974	413897	556829	.	.	5548101

**Tabla 6.-** Resultados de la espectrometría de masas, muestras experimentales.

SAMPLE	Decane	C14:0	C16:1	C16:0	C18:1	C18:0	TOTAL
C3	398949	2326535	2473237	700046	113157	.	6011924
C6	.	.	317203	37251	.	.	354454
C7	444798	2412033	979383	992197	364045	.	5192456
C9	396951	2318870	322574	.	.	.	3038395
C10	521069	3615880	1470911	.	104958	.	5712818
C12	441971	2398544	416121	59243	.	.	3315879
C13	.	2324844	1095376	.	77135	.	3497355
C16	506153	3361653	970018	.	47645	.	4885469
C18	491699	3211552	184494	.	47605	.	3935350
C19	484106	3050391	879458	.	40127	.	4454082
C20	492781	2861869	1409794	1490333	651217	51887	6957881
C22	399008	2323410	733649	.	.	.	3456067
C24	438723	2365699	356648	.	.	.	3161070
C26	394254	2289916	37442	52660	.	.	2774272
C28	477715	2764765	474344	503349	.	.	4220173
C29	249272	2289189	772624	1110783	274470	.	4696338
C30	430061	2159413	.	.	.	.	2589474
C35	260269	2733185	96209	48666	36936	.	3175265
C37	449078	2436873	133351	36276	.	.	3055578
C39	395510	2280846	.	.	.	.	2676356
C41	238498	2335658	949241	1027248	341545	47931	4940121
C43	395238	2290615	1528505	2418269	904251	177698	7714576
C45	441770	2385333	.	60029	.	.	2887132
C46	.	192333	449911	355014	85900	.	1083158
C48	.	.	884408	787329	376227	.	2047964
C49	444898	2647158	353530	369758	.	.	3815344

**Tabla 7.-** Resultados de la espectrometría de masas, muestras del grupo control.

Desde el punto de vista cuantitativo, la espectrometría de masas se utiliza ampliamente para la determinación cuantitativa de uno o más componentes en sistemas orgánicos complejos (Ayala, 2011).

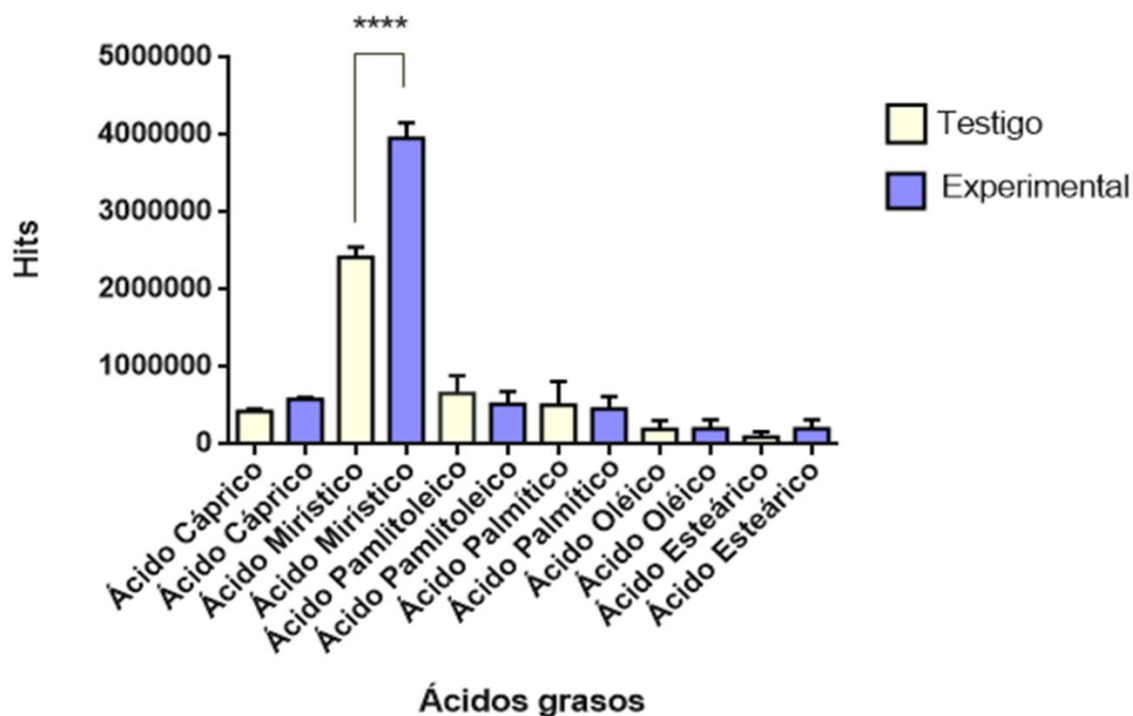
Los resultados de la espectrometría de masas muestran en nomenclatura abreviada respecto a la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), que en el presente trabajo se encuentran los siguientes ácidos grasos saturados comunes:

Nomenclatura	Ácido graso
C10:0	Ácido Cáprico/ decanoico
C14:0	Ácido Mirístico/ tetradecanoico
C16:0	Ácido Palmítico/ hexadecanoico
C16:1	Ácido Palmitoleico/ delta-9-cis-hexadecénico
C18:0	Ácido Esteárico/ octadecanoico
C18:1	Ácido Oléico/ cis-9-octadecanoico

**Tabla 8.-** Ácidos grasos comunes, presentes en el grupo experimental y en el grupo control.

A continuación, en la figura 28, se muestran los datos de ácidos grasos de la comparación entre ambos grupos de estudio, el grupo control y el grupo experimental; dónde se puede notar la elevada concentración relativa de ácido mirístico del grupo experimental respecto al grupo control.

## Ácidos grasos saturados comunes presentes en *Aedes aegypti*



**Figura 28.-** Comparación de ácidos grasos saturados comunes presentes en el grupo experimental y en el grupo control.

Se realizó un análisis de Anova a los datos de los ácidos grasos obtenidos mediante la espectrometría de masas, el análisis nos permitió observar si existían diferencias significativas entre los grupos de ácidos grasos presentes en el estudio.

Para localizar dicha diferencia y poder cerciorarnos de la significancia se realizó una prueba de Tuk, la cual nos señaló una diferencia significativa presente en el ácido mirístico del grupo experimental con respecto al ácido mirístico del grupo testigo, con un valor de  $P < 0.0001$ .

En la tabla 9 que se presenta a continuación se muestran los tipos de ácidos grasos existentes en los grupos de estudio y algunas funciones generales que cumplen en diversos organismos.

Nomenclatura	Ácido graso	Función
<b>C10:0</b>	Ácido Cáprico	El ácido decanoico en la dieta para proporcionar un mejor control de las convulsiones (Augustin, 2018), Además de los efectos antivirales y antibacterianas, DA de, informaron actividades biológicas que incluyen la regulación de las vías de señalización y la homeostasis redox en varios tipos de células humanas (Yang, 2018).
<b>C14:0</b>	Ácido Mirístico	Estimula la síntesis de Ceramida (Martínez,2015), Procesos de miristoilación con la proteína G1 y G2 para activación de señalización celular (Álvarez, 2019).
<b>C16:0</b>	Ácido Palmítico	Induce la apoptosis de hepatocitos (Martínez,2015), Procesos de palmitoilación con la proteína G1 y G2 para activación de señalización celular (Álvarez, 2019).
<b>C16:1</b>	Ácido Palmitoleico	El ácido palmitoleico (POA) se ha descrito como un FA antiinflamatorio (De Souza, 2018).
<b>C18:0</b>	Ácido Esteárico	Emite señales a través de una vía específica para regular la actividad de la mitofusina y, por lo tanto, la morfología y la función mitocondrial en el cultivo celular. (Senyilmaz-Tiebe,2018).
<b>C18:1</b>	Ácido Oléico	Como el FFA más abundante en el torrente sanguíneo, el ácido oleico (OA) tiene la capacidad de inducir la diferenciación adipogénica en las células estromales derivadas de tejido adiposo humano (hADSC) (Zeng R, 2018).

**Tabla 9.-** Funciones generales de los ácidos grasos presentes en los grupos de estudio.

## 11. Discusión

El entorno bioquímico de la célula y/o el tejido de huésped influye sobre la replicación viral de los Flavivirus, los cuales reorganizan este entorno para el beneficio de sus necesidades (Chotiwan *et al.* 2018).

En otras palabras, los metabolitos derivados de células hospederas como lípidos, azúcares y aminoácidos se utilizan para producir la progenie viral, ayudar a evadir el sistema inmune del huésped y permitir la finalización exitosa del proceso de replicación y ensamblaje viral.

El virus del dengue es uno de los principales representantes del género Flavivirus, este virus ha adquirido una mayor importancia clínica y epidemiológica debido a sus altos registros de incidencia, es transmitido por la picadura de las hembras infectadas de mosquitos del género *Aedes*.

Nuestro estudio se centró en el análisis de la composición química en la cutícula de *Aedes aegypti*, evaluando la respuesta de un grupo expuesto y posteriormente infectado comprobado al virus dengue tipo 2 (DENV2); contrario a un grupo testigo no expuesto.

Se investigó si existía un cambio diferencial entre los lípidos que constan en la cutícula del grupo alimentado únicamente con sangre (testigo), contrario a un segundo grupo alimentado con sangre más DENV2 (experimental).

El análisis de espectrometría de masas que se empleó para la determinación de los compuestos cuticulares en éste trabajo, mostró que la cutícula de los moscos *Aedes aegypti* infectados pertenecientes al grupo experimental expresan una elevada concentración de ácido mirístico con respecto a la cutícula del grupo control.

Los resultados que se observan en las gráficas, corresponden al disparo electrónico de la cámara de ionización del espectrómetro de masas, no se logró obtener el resultado de los tiempos de retención requeridos para la determinación absoluta de

los compuestos cuticulares, sin embargo, obtuvimos la abundancia relativa de los compuestos en ambos grupos.

De esta manera, los componentes que en éste caso son lipídicos, específicamente ácidos grasos; tienden a presentarse a través del número de hits que presenta la molécula en la cámara de ionización.

Dentro de los ácidos grasos expresados, se detectó un aumento significativo del ácido tetradecanoico conocido comúnmente como ácido mirístico en el grupo experimental.

Los ácidos grasos son compuestos de importancia básica en biología. Sus funciones en el almacenamiento de energía metabólica, la estructura celular, biomembrana y la fisiología reguladora, parecen aplicarse de manera general, a la mayoría de los organismos. Estos patrones generales también se aplican a los insectos. (Stanley-Samuelson *et al.* 1988).

La producción de diversos compuestos químicos por los organismos y su liberación al ambiente, afecta significativamente las condiciones de éste e influye sobre el crecimiento, la salud, la conducta y en suma la biología poblacional de plantas, animales y microorganismos, de modo distinto al relacionado con la nutrición; este hecho determina la existencia de interacciones bióticas particulares, las interacciones químicas entre los organismos. (Anaya, 1994).

Esta comunicación se encuentra dentro de la ecología química, la cual trata de explicar estas interacciones, identificando y definiendo los compuestos químicos involucrados, y estableciendo cómo la percepción de estos compuestos modifica el comportamiento y la fisiología de los organismos, las interacciones con otros organismos y por último el éxito reproductivo o valor adaptativo de los procesos de comunicación química para los organismos participantes. (Martínez y Laencina, 1995).

Cuando un mensaje químico es intercambiado entre miembros de la misma especie o de diferentes especies, las sustancias que entregan estos mensajes son llamados semioquímicos (Robles, 1994).



Por consiguiente, cabe la posibilidad de que exista una correlación entre el aumento de ácido mirístico en el grupo experimental y la comunicación intraespecífica, infiriendo la posibilidad de que este ácido graso se relacione con procesos ejecutados por semioquímicos en invertebrados.

Consta evidencia que argumenta que en general los ácidos grasos, en conjunto con triglicéridos (TG) y fosfatidilcolinas (PC) se emplean para la replicación del virus dengue en los mosquitos, desempeñando funciones tales como, suplir los cambios en la conformación de balsas lipídicas, en el complejo de replicación viral (VRC) y en el reclutamiento como fuente de energía. (Stanley-Samuelson *et al.* 1988).

Existen estudios previos centrados en la descripción de la composición química en la cutícula de dos ácaros, *Tetranychus evansi* y *Tetranychus urticae*, en donde se presenta el perfil químico de ambas especies, se realizaron análisis cromatográficos de los extractos por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Gases (CGMS), se evaluó la concentración relativa de los compuestos presentes en la cutícula, la polaridad de esos compuestos, su concentración total relativa, y la presencia diferencial de compuestos en la cutícula de las dos especies de ácaros.

Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la evaluación del lipidoma cuticular de mosquitos, y de una comparación entre el lipidoma de un grupo que presenta una infección contraria a un grupo testigo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la expresión diferencial de lípidos con infecciones nos hace pensar que existe todo un cambio conformacional y de expresión de moléculas cuando el insecto sufre de alguna invasión viral.

Para la comprobación de las infecciones del grupo experimental, se seleccionó la metodología de detección de ARN de DENV en las excretas de los mosquitos. Los mosquitos *Aedes aegypti* individuales liberan grandes cantidades de ARN del virus del dengue (DENV) en sus excretas que pueden detectarse de forma no sacrificial con el tiempo después de la exposición oral al virus. (Fontaine, 2016).

La metodología empleada para la comprobación de las infecciones del grupo experimental se seleccionó debido a que en la actualidad los ensayos de

competencia vectorial son sacrificatorios y nosotros requeríamos la cutícula del mosquito para lograr la obtención de resultados de tal cambio.

Una vez realizado el análisis de PCR y determinar cuáles eran los individuos que estaban infectados, se efectuó el análisis que determinó el perfil lipídico del grupo.

Por último, el aumento de ácidos grasos específicamente ácido mirístico, en las hembras de *Aedes aegypti* cuando se encuentran infectadas con DENV2 se infiere que aumenta la efectividad de comunicación por semioquímicos.

Esto debido principalmente al trabajo realizado por Dweck, 2015 donde se centraron en el estudio de las neuronas olfativas receptoras de la especie *Drosophila melanogaster*, en el cual se mostró que el odorante metil laurato junto con dos odorantes adicionales derivados de la mosca que fueron miristato de metilo y palmitato de metilo, median la atracción a través de una vía separada de la involucrada en el cortejo y los odorantes identificados previamente fueron atractivos para varias especies estrechamente relacionadas.

Dicho trabajo es de suma importancia porque nos muestra como el ácido mirístico se relaciona con la comunicación por semioquímicos en los insectos y nos acerca a la comprensión de la excitación sexual masculina basada en el olfato y como ésta se está volviendo más completa.

Se infiere que el cambio en la concentración de ácido mirístico en el grupo experimental se relaciona con la atracción de oviposición en el mosquito ya que como menciona (Sivakumar, *et al.* 2011) el ácido tetradecanoico también conocido como ácido mirístico es un compuesto involucrado en la mediación de la oviposición para *Aedes aegypti* en donde el mayor valor observado de OAI (índice activo de oviposición) de 0,65 se observó en 10 ppm transcurridas 24 horas.

Este trabajo puede ser la base en futuros proyectos que ayudaran a explicar la ecología química intraespecífica de la especie *Aedes aegypti* y ampliar el campo de las herramientas que se pueden emplear para el control de vectores de enfermedades.

## 12. Conclusiones

- 1.- La espectrometría de masas proporcionó como resultado la composición de ácidos grasos por individuo.
- 2.- Los principales componentes lipídicos en la cutícula de *Aedes aegypti* son ácidos grasos comunes y alcanos.
- 3.- La abundancia relativa de los iones de ácidos grasos es mayor en el ácido mirístico del grupo experimental con respecto al grupo control.
- 4.- El ácido mirístico perteneciente al grupo experimental presenta un cambio significativo con respecto al ácido mirístico del grupo control.

### 13. Literatura citada

- Ibáñez-Bernal, S., D. Strickman & C. Martínez-Campos. 1996. Culicidae, Cap. 38, pp. 591- 602. In: Llorente-Bousquets, J., A. N. García-Aldrete y E. González-Soriano (Eds.). Biodiversidad taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento. UNAM, México. 660 pp.
- Chotiwan N, Andre BG, Sanchez-Vargas I, Islam MN, Grabowski JM, Hopf-Jannasch A, et al. (2018) Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathog* 14(2): e1006853. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006853>.
- Cabezas C. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. (2005). *Rev. peru. med. exp. salud pública*, 22, 3. Cabezas, C. (2015). Enfermedades infecciosas emergentes – reemergentes y sus determinantes. *Rev. peru. med. exp. salud pública*, 32(1), 7-8.
- GJ Blomquist, AG Bagnères (Eds.), *Hidrocarburos de insectos: biología, bioquímica y ecología química*, Cambridge University Press. Publicado en los Estados Unidos de América por Cambridge University Press, Nueva York (2010) pág. 492
- Guzmán-Mendoza, R., Calzontzi-Marín, J., Salas-Araiza, M. D., & Martínez-Yáñez, R. (2016). La riqueza biológica de los insectos: análisis de su importancia multidimensional. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)*, 32(3), 370-379.
- Montes, T. (2001). Actualización en Dengue. Parte 1. *Rev Soc Ven Microbiol*, 21, 1.
- Zhang, W., Chipman, P., Corver, J., Jhonson, P., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T., Strauss, j., Rossmann, M., Kuhn, R. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*, 10(11), 907-12.

- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L., Harrison, S., Skehel, J., Wiley, D. (1999). Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol*, 16, 3–9.
- Velandia, M., y Castellanos, J. (2011). Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infection*, 2011, 15(1), 33-43.
- Stiasny, K., Koessl, C., Heinz, F. (2003). Involvement of Lipids in Different Steps of the Flavivirus Fusion Mechanism. *J Gen Virol*, 77 (14), 7856-62.
- Stiasny, K., y Heinz, F. (2006). Flavivirus membrane fusión. *J Gen Virol*, 87, 2755– 2766
- Ibáñez, B.S. 1999. Los díptera hematófagos y taxa relacionados de dos áreas protegidas del estado de Yucatán, México (Insecta). Informe final del Proyecto G-O11. CONABIO.
- Morón, M. A. y J. Valenzuela. 1993. Estimación de la biodiversidad de insectos en México; análisis de un caso. Vol. Esp. Rev. Soc. Mex. Historia Natural XLIV: 303-312.
- Groombridge, B. ed. 1992. Global biodiversity: Status of the Earth's living resources. Chapman and Hall. London.
- Llorente-Bousquets, J., y S. Ocegueda. 2008. Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 283-322.
- Wilson, Robert. (2010). P. J. Gullan and P. S. Cranston: The insects: an outline of entomology (4th edition). *Journal of Insect Conservation*. 14. 10.1007/s10841-010-9351-x.
- Wang, Y., Yu, Z., Zhang, J. y Moussian, B. (2016). Regionalización de lípidos superficiales en insectos. *Actas. Ciencias Biológicas*, 283 (1830), 20152994.
- Laredo-Tiscareño, S., & Guo, X., & Bocanegra-García, V. (2012). Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular. *CienciaUAT*, 6 (3), 27-33.
- Fontaine, A. et al. Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes. *Sci. Rep.* 6, 24885; doi: 10.1038/srep24885 (2016).

- Hoffmann, E. and Stroobant, V. 2001. Mass spectrometry. Second edition. Wiley.
- Kazek M, Kaczmarek A, Wrońska AK, Boguś MI (2019) Diet influences the bacterial and free fatty acid profiles of the cuticle of *Galleria mellonella* larvae. PLoS ONE 14(2): e0211697.
- Sivakumar, R., Jebanesan, A., Govindarajan, M., & Rajasekar, P. (2011). Oviposition attractancy of dodecanoic, hexadecanoic and tetradecanoic acids against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *European review for medical and pharmaceutical sciences*, 15(10), 1172–1175.
- Naoko Yoshinaga (2016) Función fisiológica y aspectos ecológicos de los conjugados de ácidos grasos y aminoácidos en insectos, *biociencia, biotecnología y bioquímica*, 80: 7, 1274-1282, DOI: 10.1080 / 09168451.2016.1153956.
- Stanley-Samuelson , RA Jurenka , C. Cripps , GJ Blomquist , M. de Renobales
- Ácidos grasos en insectos: composición. metabolismo. y significado biológico *Arco. Insecto Biochem. Fisiol.* , 9 ( 1 ) ( 1988 ) , pp. 1 - 33 , 10.1002 / arch.940090102
- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry (Illinois: Allured Publishing Corporation).
- Melo, C., Delafiori, J., Dabaja, M. Z., de Oliveira, D. N., Guerreiro, T. M., Colombo, T. E., ... Catharino, R. R. (2018). The role of lipids in the inception, maintenance and complications of dengue virus infection. *Scientific reports*, 8(1), 11826. doi:10.1038/s41598-018-30385-x
- Zhang, J., Zhang, Z., Chukkapalli, V., Nchoutmboube, JA, Li, J., Randall, G., ... Wang, X. (2016). Los virus de ARN de cadena positiva estimulan la síntesis de fosfatidilcolina del huésped en los sitios de replicación viral. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América* , 113 (8), E1064 – E1073. doi: 10.1073 / pnas.1519730113

- Zhang, Z., He, G., Filipowicz, N. A., Randall, G., Belov, G. A., Kopek, B. G., & Wang, X. (2019). Host Lipids in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Frontiers in microbiology*, 10, 286. doi:10.3389/fmicb.2019.00286
- Heaton, NS, y Randall, G. (2010). La autofagia inducida por el virus del dengue regula el metabolismo de los lípidos. *Celular y microbio* , 8 (5), 422–432. doi: 10.1016 / j.chom.2010.10.006
- Averhoff WW, Richardson RH (1974) Pheromonal control of mating patterns in *Drosophila melanogaster*. *Behav Genet* 4(3):207–225.
- Tompkins L (1984) Genetic analysis of sex appeal in *Drosophila*. *Behav Genet* 14(5): 411–440.
- 
- BRUSCA, B. R. (2005). Invertebrados. En B. R. BRUSCA, *Invertebrados. 2da edición* (pág. 1005 p. (Unidades 2 a 25 del programa teórico)). España (traducción de la versión en inglés de 2003). : McGraw Hill.
- Chapman, R. (2013). *The insects structure and function* . Cambridge: Fifth Edition.
- Eiman, M. I. (2016). *Directrices para la prevención y control de Aedes aegypti*. Cdad. Autónoma de Bs. As., República Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
- Gómez, E. A. (2013). Distribución geográfica de mosquitos adultos (Diptera: Culicidae) en áreas selváticas de Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 685-689 p.
- González, C. R. (2016). *Manual de culícidos (Díptera: Culicidae) de la zona norte y centro de Chile incluyendo la isla Pascua*. Chile, Santiago: Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile.
- Gubler, D. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 480-496 p.
- Ibáñez, B. S., & Hernández, O. V. (2006). Informe final del Proyecto CS004 Catálogo de autoridad taxonómica orden díptera (Insecta) en México. Parte 1.

Suborden Nematocera. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS004. México. . *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 33.

- Ibáñez-Bernal, S. D.-C.-B.-A.-S. (1996). Biodiversidad taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento,. *UNAM, México.*, 591-602.
- Martínez, E. (2008). Dengue. *Estudios Avanzados*, 1-20 pag.
- Miguel Carles, T. H.-A. (2015). Orden Diptera. *Revista IDE@ - SEA*, 22 pág.
- Ministerio de Salud, D. G. (2014). *Curso virtual "Vigilancia y control de brotes de dengue"*. Lima, Perú.
- Montero, G. (11 de 09 de 2009). *Blog FCA*. Obtenido de Recopilación: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Morón, M. A. (1993). Estimación de la biodiversidad de insectos en México; análisis de un caso. *Rev. Soc. Mex. Historia Natural XLIV*, 303-312.
- P.J.Gullan, & Craston, P. (2011). *The insects an outline of entomology* . Malaysia: Wiley-Blackwell.
- Perera R, R. C.-J. (2012). Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLoS Pathog* 8(3): e1002584. doi:10.1371/journal.ppat.1002584, 1-18 p.
- Soto, a. D. (2011). Análisis de la composición química de la cutícula de *Tetranychus Evansy Backer* y *Pritchard* y de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Boletín científico, Centro de museos, Museo de historia natural.*, 171-190.
- Yeates, D. K. (1999). *The Evolutionary Biology of Flies*. New York: Columbia University Press.



## 15. Anexos

**Anexo I.-** Tabla de alimentación larval en *Aedes aegypti*.

Días post-emergencia	Cantidad
1	0.5 ml
2	0 ml
3	1 ml
4	1.5 ml
5	2.0 ml
6	2.0 ml
7	1.5 ml
8,9...	En función de las larvas restantes.

**ANEXO II.-** Cuantificación de RNA por nanodrop.

Cuantificación grupo experimental			Cuantificación grupo control		
Individuo	Relación 260/280	ng/ $\mu$ L	Individuo	Relación 260/280	ng/ $\mu$ L
1e	2.31	11.1	1c	9.48	0.3
2e	3.56	3.7	2c	9.48	0.2
3e	2.32	5.7	3c	2.93	2.5
4e	2.16	15.2	4c	1.74	4.3
5e	2.47	6.2	5c	1.95	11.2
6e	2.1	17.2	6c	2.08	11.2
7e	2.48	3.6	7c	2.16	11.1
8e	2.83	3.9	8c	1.58	408.7
9e	1.83	27.9	9c	1.72	2.2
10e	2.87	4.5	10c	2.51	4.4
11e	2.21	9.5	11c	2.1	0.7
12e	3.41	1.9	12c	1.72	2.2
13e	2.42	8.3	13c	1.99	8.7
14e	3.1	4.5	14c	1.37	13.8
15e	2.28	23	15c	NO	NO
16e	3.44	3.8	16c	6.41	1.7
17e	3.13	5.6	17c	1.78	96.1

18e	2.14	16.6	18c	1.92	23.5
19e	2.79	4.5	19c	1.79	145
20e	2.54	7.3	20c	1.86	64.1
21e	1.98	484.8	21c	1.76	68.3
22e	1.84	51.8	22c	1.87	39.6
23e	2.59	3.5	23c	2.68	9.7
24e	2.35	4.8	24c	4.98	2.3
25e	2.06	11.4	25c	2.93	16.4
26e	1.99	51	26c	2.18	7.8
27e	1.66	18.6	27c	2.03	11.9
28e	1.68	2.1	28c	NO	NO
29e	1.61	35	29c	2.63	4.9
30e	1.88	316.6	30c	NO	NO
31e	1.87	327.5	31c	1.75	2.4
32e	1.72	2.3	32c	1.57	9.1
33e	1.64	2.1	33c	1.76	6.1
34e	1.7	2.1	34c	1.75	28.1
35e	1.65	1.4	35c	1.86	10.6
36e	1.65	17.2	36c	NO	NO
37e	1.85	5.1	37c	1.86	33.5
38e	1.91	79.4	38c	2.52	7.9
39e	1.84	280.4	39c	1.82	122.7
40e	1.24	8.4	40c	1.8	27.4
41e	1.77	2.2	41c	2.35	13.4
42e	1.66	96.3	42c	1.8	123.4
43e	1.57	89.9	43c	1.73	62.8
44e	1.64	93.6	44c	2.23	763.2
45e	1.64	1.2	45c	1.76	117.5
46e	1.64	15.8	46c	2.03	33.7
47e	1.73	42.4	47c	1.81	84.3
48e	1.85	281.1	48c	1.84	70.3
49e	3.12	1746.6	49c	1.77	60.6
50e	1.78	180.1	50c	1.96	12.3

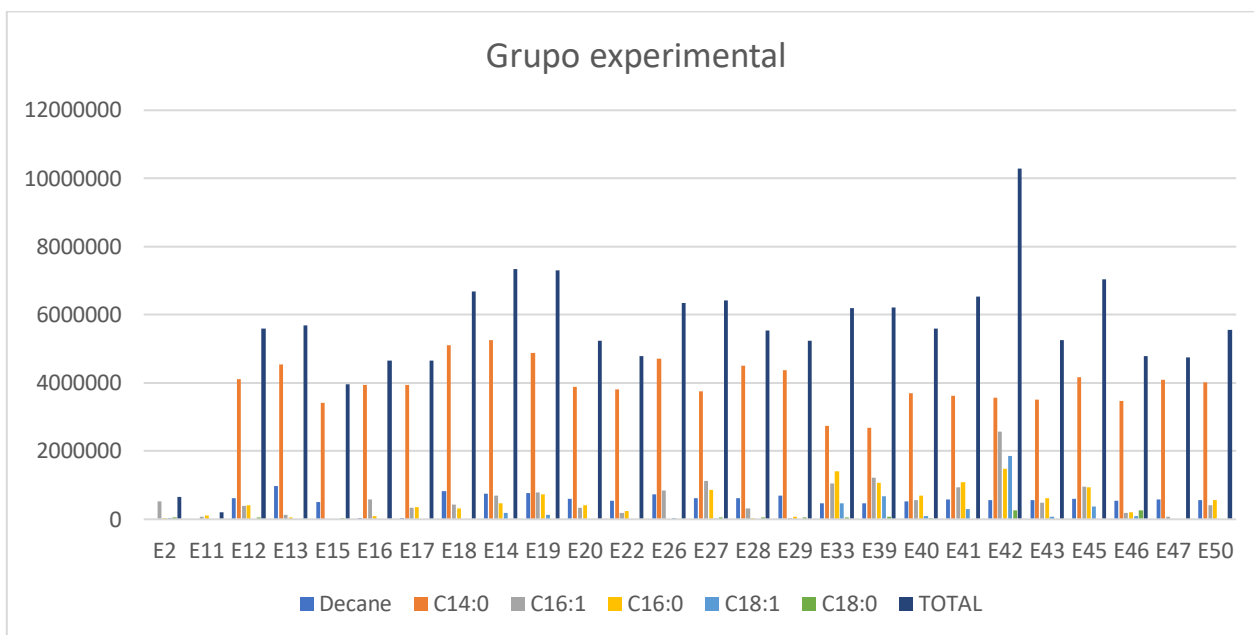
### **ANEXO III.-** Protocolos de tinción de geles de agarosa.

#### **Protocolo preparación para geles de agarosa**

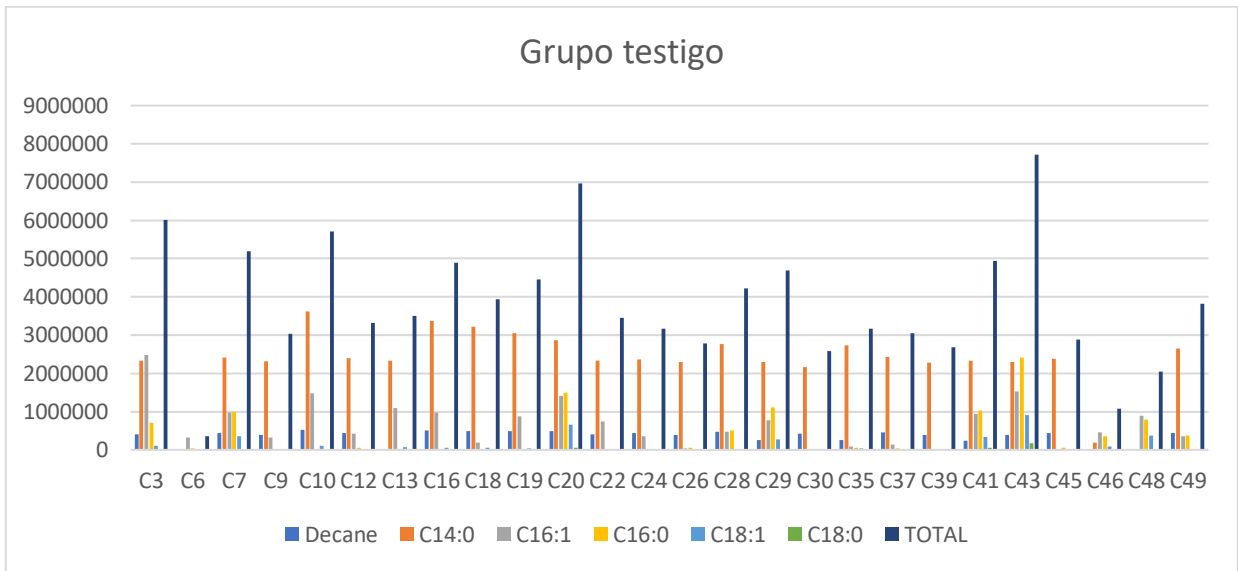
- 1.- Se pesó la agarosa correspondiente para la preparación de un gel al 1.2%
- 2.- Se disolvió en un buffer de TAE y se fundió con ayuda de un microondas, hasta obtener una solución homogénea y transparente.
- 3.-Se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de Gel Red mientras la solución de gel aún estaba caliente.
- 4.-La solución se vació en un molde para corrida de geles y se le colocó un peine para los pozos y se dejó solidificar.
- 5.- Se cargaron las muestras y se corrió el gel con un voltaje de 100 A durante 45 minutos.
- 6.-Los geles se visualizaron con ayuda de un transiluminador.

**ANEXO IV.-** Muestras para espectrometría de masas.

Grupo control		Grupo experimental
18c		2e
19c		19e
20c		28e
22c		11e
39c		12e
41c		13e
45c		14e
46c		15e
47c		16e
48c		17e
6c		18e
49c		20e
10c		22e
43c		26e
13c		27e
3c		29e
7c		33e
12c		39e
37c		40e
30c		41e
35c		42e
28c		43e
16c		44e
26c		45e
29c		46e
9c		47e
24c		50e



**Figura 26.-** Gráfico de abundancia relativa de los iones de ácidos grasos en el grupo.



**Figura 27.-** Gráfico de abundancia relativa de los iones de ácidos grasos en el grupo testigo.

Cuernavaca, Morelos a 24 de enero de 2022.

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

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **KARLA YANELI BECERRIL GONZÁLEZ**, con el título del trabajo: **Composición lipídica en la cutícula de *Aedes aegypti* durante la infección con DENV2.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el **voto aprobatorio** para que pueda optar por la Modalidad de **Titulación por Tesis** como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

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

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: M. EN C. VERÓNICA CHÁVEZ LÓPEZ

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: M. EN C. MARÍA LUISA BARROSO GARCÍA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ  
MENDOZA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. JORGE ARMANDO CIME CASTILLO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN C. GRECIA GABRIELA HERNÁNDEZ DÍAZ

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

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

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

### Sello electrónico

**VERONICA CHAVEZ LOPEZ** | Fecha:2022-01-24 14:31:59 | Firmante

Cs5aiz9TSY7us40uifcw3PQyG7HT3bzrlwVEolbrRysGm8CMY2lviFDOW0ljcKrH8XTeJ1cSO7/iv3x6X19o8N+uNKPemOdt3EuZYr2b98/SgQOh2Pb9oN77H7KM2O+z1lul6KEqeOQkcmTZGQT9EIC737pzbzkt7NZtN6EzpvPpFnDulaQ0lbsDS+wbWFqKZgl0KOHhbcRiwkEe5mWokJAWGlfqHpOets0zm0kLYQ5tPKpAW8DrFPeizEWL9AcuUE6loclLvapoRpxct6gf6nKA8lSuHWccn5dWBtm5nZwlbpZO6NKjN4w5ZJMtoCtSGEMXky1U2eF4Q6jRgMw==

**MARIA LUISA BARROSO GARCIA** | Fecha:2022-01-24 15:14:01 | Firmante

eMiDM+ypvf6ZZ6H/zShozi9zOJr54zY4jdCrAKsW100oggRohG/BV+2nchSn929hBp4a2FdLztcu4wHf/39PaySN2Htt3nGUPQdGxPUwxFuuintsPvxBVzBdctxHlw8Ci4UWM9bYc5eidP0Yd8+3CBvNyEoFYgl464zmHkWLwRx/PBWTcLPSWj2JZkDrZEBlvF+FMA6F2pWDEKcHz6/2yJ21bm2A3GykNY7I8Nto3RtR/YWR+6DChEEGsR8IMqmoE3oXBYgkePAdm1Bm1e7DpadRKHrdtGRIBfF/JLsxjR4crQoKaA5uLvYKBp0hC+xtXkzSaylleNKqAmoyw3Q==

**CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA** | Fecha:2022-01-26 16:19:35 | Firmante

XU/W0SbeuU33/5icQzhoc3pxb6iSsixqRBMilqDoQpl1BDzB87uGdYnIKB9JDh6tcx2FCQpciXDzUWOLvL9Norf1+FyyhEu/SenOD0i0kYVWnivismwD2yEoBEJQAul/2ut+rKGSDC+ori3HnITVw28u+J6lw8tlWam0NyaAB8e98HhIrVAC1ZQzV9XAkSs0kxcWXF4rNIOeDEV0dvVIZBPVYwp0QaX+QX2gGtAlPnNv66lZg8fY+1o+S93VqtFnE2IDO27B3/Bn5RXvANPIB/3tYAK9l5CoaBtT8hnnN2tr8Jo91O7JAnXjSBVfX1lzzu1WLU8/KWjpmc9D99qA==

**JORGE ARMANDO CIME CASTILLO** | Fecha:2022-01-28 10:12:44 | Firmante

P/b0IO5NtwuOSlqrXMrPKhsPcVeED3h4K1yCSJu01ITgFfE3eFnJSOs8QSp4aTbIVgVlxnFbcU0pYXn2IMfz3QDmkrbYkgeIKoyaWHgUugm3L76M1HcsWggGLxx/zriqTsmNUo1neHtGf/wOtfmDc8L+Vjj30SQJFUCWCtlI5h1jqQjoDYFqbXLH8aP94nF3DfAupeplLTaf2a58YdoOPUfKOF8/Sv+53XriBzWCq44GI0FcGBdfw9X3MC3+O3CPYzXldkFlrS10oQYP3BFDXThrUG1EMRvglj4PLbFF7wNHvCWfmd1syN0ymJGysCA3/G2hHgZl1+mfDgfGB4w==

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



6aM18YHC2

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9zJOWkqmcAbUgmhmAcddggcwH1E7fEzxe>

