

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Especificidad del priming inmunológico en el mosquito
Aedes aegypti durante un reto heterólogo con los serotipos 2 y 4 del
virus del dengue”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Biól. Juan Manuel Hernández Tablas

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE, 2022

“No basta con enunciar la verdad, hay que proclamarla”

-Louis Pasteur-



Instituto Nacional
de Salud Pública



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

La presente investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza en el Departamento de Infección e Inmunidad del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI), perteneciente al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca, Morelos; México.

El estudiante con número de beca 961411 agradece el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma del Estado de Morelos** y su **Facultad de Ciencias**.

Gracias por brindarme una educación integral y de calidad.

Al **Dr. Humberto Lanz Mendoza** por la paciencia; pero sobre todo por la confianza que me ha brindado. Gracias por motivarme con sus ideas.

A la **Dra. Verónica Narvaez Padilla** y **Dra. Sonia Dávila Ramos** por el acompañamiento en cada una de las evaluaciones que se hicieron del proyecto. Sus observaciones en cada uno de los tutorales fueron fundamentales para darle forma a la presente investigación.

Al **Dr. Jorge Armando Cime Castillo** mi estimado amigo y colaborador. Gracias por tus consejos para ayudarme a mejorar profesional y personalmente.

A la **C. Dulce Verónica Sánchez León** y **L.A. María Cristina Aranda Soberanes** secretaria y jefa del posgrado en Ciencias de la UAEM por todas las facilidades brindadas en los procesos administrativos. Gracias por el seguimiento y sobre todo por la paciencia.

A mis **amigos del L3PA**. Gracias por su compañía, y más aún por esas platicas tan divertidas -esas tardes noches- en la que los experimentos se alargaban de más.

A cada uno de los **miembros del jurado revisor**. Gracias por el tiempo dedicado a la evaluación de la presente investigación. Agradezco enormemente sus comentarios y sugerencias para mejorar la estructura y contenido de esta tesis.

Presidente **Dr. Verónica Mercedes Narváez Padilla**

Secretario **Dr. Otoniel Rodríguez Jorge**

Vocal **Dr. Jorge Armando Cime Castillo**

Suplente **Dr. Agustín Reyes Perez**

Suplente **Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza**

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	7
1.- INTRODUCCIÓN	8
1.1.- Dengue.....	8
1.1.1.- Epidemiología de la enfermedad del dengue en México.....	9
1.2. Virus del Dengue (DENV).....	11
1.2.1. Ciclo de replicación viral.....	15
1.3. <i>Aedes aegypti</i> : Insecto vector.....	20
1.3.1. Ciclo de transmisión: Interacción virus-vector.....	22
1.4. Respuesta inmune antiviral.....	24
1.4.1. Especificidad de la respuesta inmune.....	28
2.- ANTECEDENTES	30
2.1. Inmunidad innata en insectos.....	30
2.1.1. Inmunidad innata en mosquitos.....	30
2.2. Priming inmunológico.....	31
2.2.1. Priming inmunológico en mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	32
3.- JUSTIFICACIÓN	35
4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	36
4.1.- HIPÓTESIS	36
5.- OBJETIVOS	36
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1. Crianza de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	37
6.2. Cultivo de líneas celulares.....	37
6.3. Propagación viral.....	38
6.4. Inactivación de partículas virales.....	39
6.5. Infección de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	39
6.6. Aislamiento de RNA viral en excretas de mosquitos.....	42
6.7. Extracción de RNA viral en excretas de mosquitos.....	42

6.8. Cuantificación de RNA viral.....	43
6.9. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	43
6.10. Detección de RNA viral mediante qPCR.....	44
6.11. Secuenciación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.....	45
7.- RESULTADOS.....	47
7.1. Secuenciación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.....	47
7.2. Infección de células C6/36 con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.....	51
7.3. Cuantificación relativa de la proteína no estructural NS1.....	53
7.4. Confirmación de la infección por DENV en mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	55
7.5. Cinética de infección por DENV en excretas de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	58
8.- DISCUSIÓN.....	61
9.- CONCLUSIÓN.....	71
10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÉNDICE.....	92

RESUMEN

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen viral que se transmite a los seres humanos a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*; principalmente *Aedes aegypti* -infectadas con el virus del dengue- (WHO, 2020). En los últimos años, la incidencia de esta enfermedad se ha visto incrementada; debido a que un 40% de la población mundial se encuentra expuesta en áreas donde el dengue es endémico y por lo tanto existe un riesgo inminente de transmisión.

Lo anteriormente expuesto, destaca la importancia de implementar medidas encaminadas a controlar las poblaciones del insecto vector e interrumpir la transmisión de la enfermedad, así como conocer más sobre la interacción que se establece entre el mosquito vector y el virus del dengue. Es por ello, por lo que la presente investigación tiene como objetivo principal abordar un fenómeno muy particular en los mosquitos *Aedes aegypti* denominado priming inmunológico. Este concepto se ha definido como la capacidad del sistema inmunitario de los mosquitos para retener y reutilizar información sobre patrones moleculares para mejorar la respuesta inmune después de una exposición previa a una dosis subletal de un patógeno o material derivado del patógeno que conduce a un aumento de la respuesta inmune, haciendo que el insecto sea resistente a una futura infección. Los experimentos realizados en este trabajo, han evaluado la especificidad de este mecanismo realizando infecciones homologas y heterólogas con dos variantes genéticas del virus del dengue en mosquitos *Aedes aegypti*. Los resultados hasta ahora obtenidos muestran una reducción en la carga viral (n. de copias de RNA) en mosquitos que han tenido un encuentro previo con partículas virales inactivadas por luz UV, así como una protección inmune mejorada en mosquitos *Aedes aegypti* que tienen un reto heterólogo vs. un reto homólogo.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares y celulares por los cuales el priming inmunológico limita la replicación viral en el mosquito. Sin embargo, el trabajo aquí presentado ofrece una visión importante sobre la especificidad de la respuesta inmune durante el priming inmunológico con dos variantes distintas del virus del dengue.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa de origen viral que se transmite a los seres humanos a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*; principalmente *Aedes aegypti* -infectadas con el virus del dengue- (WHO, 2020). Actualmente, es considerada como una de las enfermedades virales más importantes que se transmiten a los seres humanos por artrópodos en más de 100 países tropicales y subtropicales del mundo (Guzman et al., 2010; Bhatt et al., 2013)

La infección se puede originar por alguna de las cuatro variantes genéticas del virus, denominadas DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Estos cuatro virus se denominan serotipos porque cada uno de ellos interactúa de manera diferente con los anticuerpos del suero sanguíneo humano. A pesar de estas diferencias, la infección con cada uno de estos serotipos produce la misma enfermedad y rango de síntomas clínicos en el humano (Halstead, 2008), los cuales se manifiestan entre el cuarto y séptimo día después de la picadura del mosquito (CDC, 2020). Tras su recuperación, las personas infectadas por dengue adquieren inmunidad de por vida contra el serotipo que inició la infección. Sin embargo, la inmunidad cruzada a los otros serotipos es parcial y temporal; por lo que en infecciones posteriores las personas quedan susceptibles nuevamente y con el mayor riesgo -de aquellas personas que no han sido infectadas- de contraer dengue hemorrágico, la forma más grave y potencialmente mortal de la enfermedad (Vaughn et al., 2000).

En los últimos años, se ha incrementado la incidencia de esta enfermedad; debido a que un 40% de la población mundial se encuentra expuesta en áreas en donde el dengue es endémico -particularmente en algunas regiones de Asia, el Pacífico, América, África y el Caribe- y por lo tanto existe un riesgo inminente de transmisión (Figura 1). La Organización Mundial de la Salud estima que 390 millones de infecciones ocurren cada año, de las cuales 96 millones se manifiestan clínicamente; siendo la población infantil la más afectada con alrededor de 24,000 decesos (WHO, 2020).

La detección clínica oportuna, así como el acceso a la asistencia médica adecuada han logrado disminuir las tasas de mortalidad en pacientes infectados con el virus del dengue. Sin embargo, el problema hoy en día persiste debido a que no existen tratamientos antivirales específicos, ni medicamentos eficaces para la prevención o el tratamiento de este padecimiento.

Lo anterior destaca la importancia de implementar medidas encaminadas a controlar las poblaciones del insecto vector; así como también comprender de manera más profunda la interacción entre el virus y el vector. Estas medidas se han vuelto eficaces para interrumpir la transmisión de la enfermedad, así como para reducir los efectos negativos que subyacen de ella en los países donde está presente (Suaya et al., 2009).

1.1.1. Epidemiología de la enfermedad del dengue en México

En nuestro país, el dengue representa un problema prioritario de salud pública con un aumento en la incidencia de los casos en 30 de los 32 estados de la república durante los últimos 10 años (1.7 casos por 100 000 habitantes en el año 2000 a 43.03 casos por 100 000 habitantes en el año 2012). La urbanización creciente -sin controles adecuados-, la migración humana y factores asociados al cambio climático -con modificaciones en el ámbito ecológico- han ocasionado la expansión de los insectos vectores que transmiten esta enfermedad (SINAVE, 2022).

En el territorio nacional los cuatro serotipos del virus del dengue circulan periódicamente, así como los mosquitos que lo transmiten. La infección ocurre durante todo el año, tanto en poblaciones urbanas como rurales; predominando en áreas costeras -hacia la zona meridional del país- donde las condiciones geográficas, demográficas y epidemiológicas son favorables para su transmisión (NOM-032-SSA2-2014).

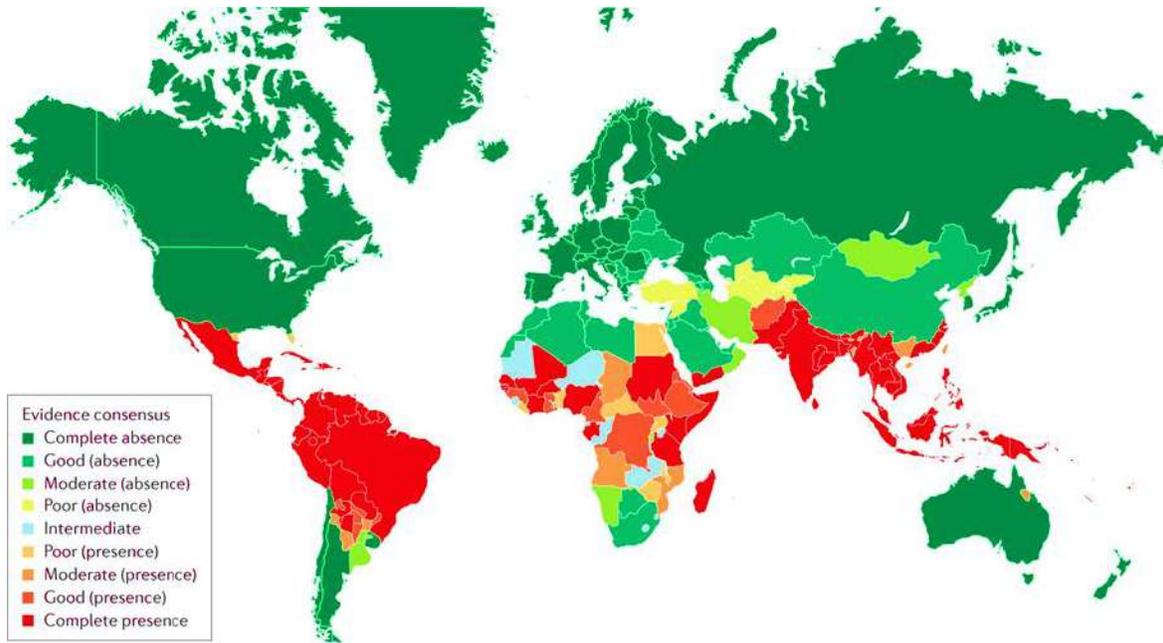


Figura 1. Diferentes regiones del mundo cuya población es susceptible para contraer dengue.

El mapa geográfico muestra en una escala de colores áreas de riesgo de transmisión de dengue en diferentes partes del mundo. En las regiones tropicales y subtropicales el dengue es endémico, es decir, que ocurre todos los años generalmente durante una temporada cuando se establecen las condiciones óptimas para la reproducción de los mosquitos vectores. Sin embargo, estas áreas también tienen un riesgo periódico de dengue epidémico, cuando un gran número de personas se infectan durante un período de tiempo corto. La información presentada en este mapa corresponde a un consenso de casos tomado Nature Reviews Disease Primers: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>

1.2. Virus del Dengue (DENV)

El virus del dengue (DENV) es un virus de RNA de cadena sencilla -con polaridad positiva- que pertenece al género *Flavivirus*; dentro de la familia *Flaviviridae*. La partícula viral tiene un diámetro de 50-60 nm, con geometría icosaédrica, y cuatro serotipos genéticamente relacionados, pero antigénicamente diferentes (Calisher et al., 1989; Henchal y Putnak, 1990; Katzelnick et al., 2015). Estructuralmente, el virus está constituido por una nucleocápside de 30 nm que contiene al genoma viral (Alcaraz-Estrada et al., 2010) (Figura 2A). A su vez, la nucleocápside se encuentra rodeada por una membrana lipídica que se deriva de la célula infectada (Smith et al., 2011). Finalmente, en su parte más externa se encuentran proteínas que forman una capa protectora que controlan la entrada del virus en la célula hospedera.

El genoma del virus tiene un tamaño aproximado de 11 kb y un marco de lectura abierta [ORF] que se encuentra flanqueado por dos regiones no traducidas [UTR's] altamente estructuradas que desempeñan un papel regulador en la traducción de las proteínas virales y la replicación del genoma (Tuiskunen-Bäck y Lundkvist, 2013). Posee una estructura tipo Cap en el extremo 5' y carece de estructura poli (A) en el extremo 3' (Figura 2B).

El material genético del DENV codifica para una poliproteína de 3411 aminoácidos (Shu y Huang, 2004) que se fragmenta por proteasas celulares y virales (Figura 2C) para dar origen a proteínas estructurales y no estructurales dentro de la célula hospedera (Rodenhuis et al., 2010; Wash y Soria, 2015). Tres son proteínas estructurales: la proteína de la cápside [C], la glucoproteína de envoltura [E] y la proteína pre-membrana [prM]. Siete son proteínas no estructurales [NS]: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5; las cuales juegan un papel importante en la replicación, la traducción, el procesamiento proteolítico de la poliproteína y el ensamblaje viral, además de que algunas de estas se encuentran involucradas en la inhibición de la respuesta inmune del humano (Clyde et al., 2006; Muller y Young, 2013). Las características particulares de cada una de estas proteínas virales se muestran en la tabla 1.

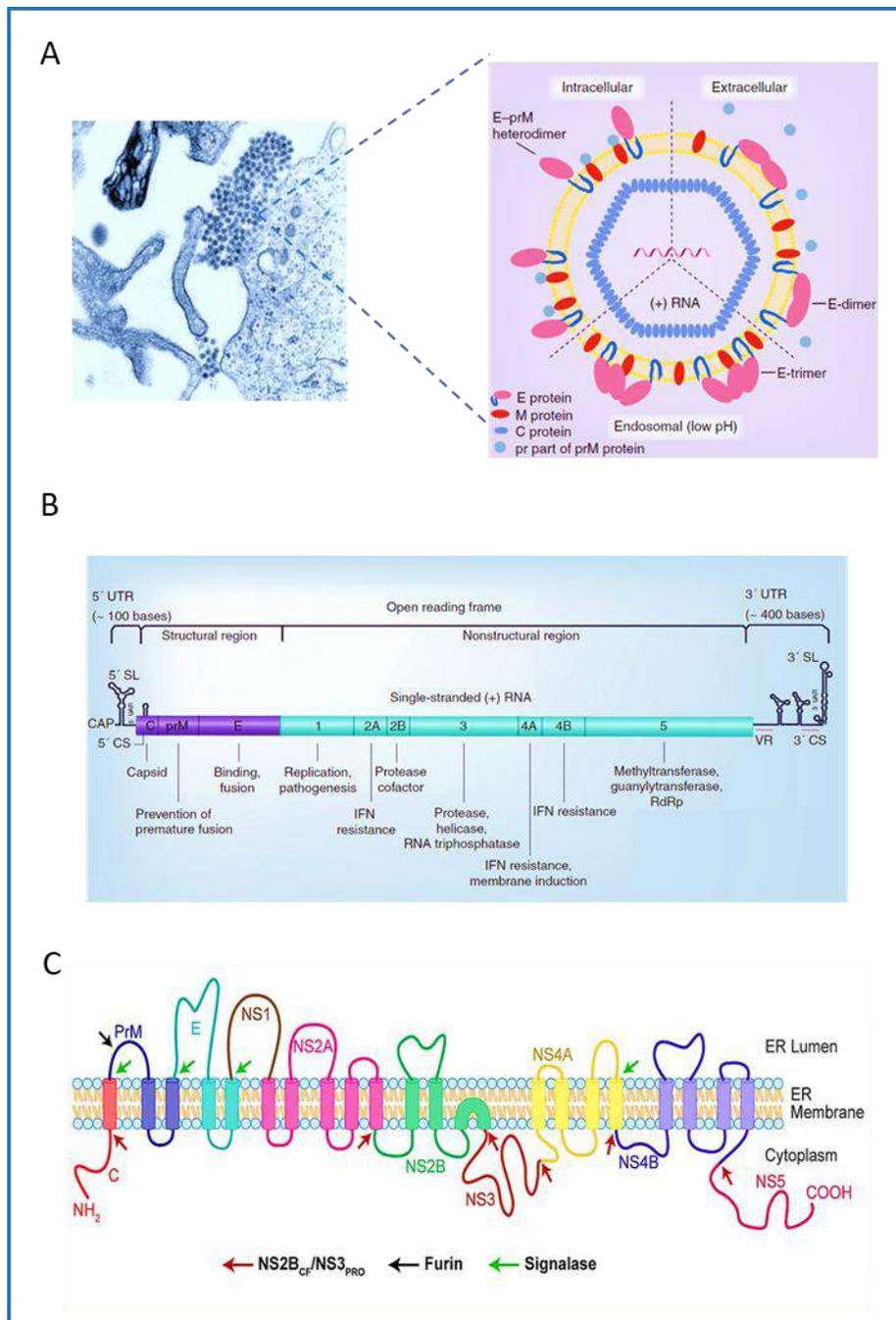


Figura 2. Organización estructural del virus del dengue. (A) Micrografía electrónica de transmisión [TEM] de partículas del virus del dengue -se observa una amplificación que permite reconocer cada uno de los elementos estructurales que constituyen a la partícula viral-. (B) Genoma viral que muestra la posición de cada uno de los genes que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales del DENV. (C) Topología de la poliproteína viral insertada en la membrana del retículo endoplásmico de la célula hospedera. Tomado de Bartenschlager y Miller, 2008; De Almeida et al., 2013.

Tabla 1. Funciones principales de las proteínas del virus del dengue.

Proteína	Tamaño (kDa)	Función principal	Referencias
C	11	Emisor de señales a través de la membrana, interactúa con el RNA viral para la formación de la nucleocápside.	Perera y Kuhn, 2008; Velandia y Castellanos, 2011.
prM/M	26	Interacciona con las proteínas de envoltura y el complejo RNA-Cápside. Evita que ocurran cambios conformacionales de la proteína E durante el ensamblaje viral.	Perera y Kuhn, 2008; Velandia y Castellanos, 2011.
E	50	Confiere al virus sus principales actividades biológicas, como son: 1) la adhesión e inserción del genoma, 2) la hemaglutinación y 3) la producción de anticuerpos neutralizantes.	Perera y Kuhn, 2008; Velandia y Castellanos, 2011.
NS1	46	Proteína secretable, involucrada en la replicación temprana del RNA y ensamblaje viral. Activación del sistema inmune innato.	Muller y Young, 2013.
NS2A	22	Involucrada en la replicación del RNA.	Xie et al., 2015.
NS2B	14	Forma un complejo con NS3 para actuar como un co-factor de actividad catalítica. Componente de la maquinaria enzimática de replicación del RNA viral.	Xie et al., 2015.
NS3	69	Funciones de helicasa durante la replicación del RNA viral. Forma un complejo con NS5 para ayudar a desenrollar el RNA.	Muñoz-Jordán et al., 2005.

NS4A	16	Participa anclando componentes de la replicasa viral a la membrana celular. Requerida para la formación de las vesículas de replicación.	Welsch et al., 2009; Muñoz-Jordán et al., 2005.
NS4B	30	Suprime la señalización de IFN β y IFN γ . Esencial para la replicación y la patogenicidad.	Grant et al., 2011; Muñoz-Jordán et al., 2005.
NS5	105	Involucrada en la síntesis de RNA viral; tiene actividad RNA polimerasa dependiente de RNA. Involucrada en el bloqueo del sistema IFN.	Muñoz-Jordán y Santiago, 2014.

C= Cápside, **E**= Envoltura, **prM/M**= pre-membrana/membrana, **NS**= No estructural, **IFN β** = Interferón beta, **IFN γ** = Interferón gamma, **IFN**= Interferón. Tabla modificada. Tomada de Guzman et al., 2016.

1.2.1. Ciclo de replicación viral

Durante la infección del virus del dengue a su célula hospedera, ocurren una serie de eventos que los virólogos han denominado ciclo de replicación (Figura 3). Este involucra: (1) la unión-entrada del virus a la célula, (2) la replicación de su genoma, (3) la síntesis y modificación de sus proteínas, (4) el ensamblaje de la partícula viral y (5) la liberación de la progenie al medio externo. Los siguientes apartados, explican con mayor detalle cada uno de estos eventos.

Adhesión y entrada

El proceso de replicación viral inicia cuando la proteína E del virus reconoce un receptor en la superficie de la membrana plasmática de la célula blanco. En líneas celulares de mosquitos -como C6/36 de *Ae. albopictus*- la proteína E interactúa con diversas moléculas para ingresar a la célula, como el receptor de laminina (Sakoonwatanyoo et al., 2006), dos glicoproteínas de 40 y 45 kDa (Mendoza et al., 2002; Salas-Benito y del Angel, 2007) y una proteína similar a tubulina (Muñoz et al., 1998). En mosquitos, varias proteínas como la prohibitina (Kuadkitkan et al., 2010), la proteína relacionada con el choque térmico (Salas-Benito y del Angel, 2007) y la proteína de unión a laminina (Sakoonwatanyoo et al., 2006), pueden actuar como receptores putativos para la infección por DENV.

Después de este reconocimiento, la membrana de la célula se pliega alrededor del virus y forma un endosoma. Una célula normalmente usa endosomas para tomar moléculas y partículas grandes del exterior de la célula para su nutrición. El virus del dengue entonces puede ingresar a una célula huésped, al secuestrar este proceso celular normal.

Liberación del genoma viral

Una vez que el virus es internalizado en la célula hospedera por el endosoma, este se dirige hacia el retículo endoplasmático [RE]. En su travesía al RE, el endosoma madura y se une a un lisosoma; el cual induce la activación de bombas de protones que acidifican el contenido de la vesícula -el pH dentro de la vesícula disminuye de 7.5 cerca de la membrana plasmática a 6.5 cerca del retículo endoplasmático-.

La disminución en el pH de la vesícula induce un cambio conformacional en la proteína E -de dímero a trímero- que permite la exposición del péptido de fusión y el anclaje inmediato a la membrana de la vesícula. Estas condiciones permiten que la envoltura del virus se fusione con la membrana endosomal y en el proceso se libere la nucleocápside viral en el citoplasma de la célula hospedera (Diamond et al., 2000; Van Der Schaar et al., 2007; Van Der Schaar et al., 2008).

Replicación y traducción del genoma viral

En el citoplasma, la nucleocápside se abre para desprender al genoma viral y se inician los procesos de replicación y traducción (Heinz y Allison, 2003; Ma et al., 2004; Qi et al., 2008).

El genoma viral se replica en el retículo endoplasmático dentro de unas estructuras denominadas complejos replicativos [RCs] que contienen RNA y proteínas virales, además de proteínas celulares (Welsch et al., 2009). Estos complejos derivados del RE concentran los componentes específicos -como lípidos y proteínas- requeridos para la replicación y la formación de los viriones, además de que protegen a las partículas virales en formación de los mecanismos de defensa de la célula hospedera (Novoa et al., 2005; Netherton et al., 2007).

Durante la traducción, los ribosomas del RE se unen al genoma viral para generar una poliproteína. Posteriormente, esta poliproteína se fracciona por las proteasas furina, signalasa y NS3 para formar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus del dengue, entre las que destacan: (1) una polimerasa dependiente de RNA (NS5) que transcribe el genoma -formando una plantilla de RNA con polaridad negativa-, (2) la proteína de la cápside que expone el sitio de escisión sobre el que actuará una proteasa, y luego un péptido señalizador para la asociación con el RE, (3) las glucoproteínas de la envoltura que se transfieren a la membrana plasmática y (4) las proteínas no estructurales.

Las múltiples rondas de replicación y traducción producen altos niveles de proteínas virales que junto con el RNA viral se ensamblan para generar nuevos viriones (Clyde et al., 2006; Limjindaporn et al., 2009).

Ensamblaje de la partícula viral

El ensamblaje de los nuevos viriones ocurre de forma simultánea en las mismas estructuras vesiculares donde se lleva a cabo la replicación y traducción del genoma viral (Chiou et al., 2003).

Una vez replicado, el RNA viral se asocia con las proteínas virales recién sintetizadas -particularmente con la proteína C- para formar nucleocápsides desnudas (Samsa et al., 2009). En el RE, las nucleocápsides adquieren una envoltura lipídica enriquecida en proteínas prM y E -confiriéndole un aspecto rugoso a la superficie de la partícula viral- a través de mecanismos aun no definidos. Tras el ensamblaje, los viriones se almacenan dentro del RE de manera muy ordenada y posteriormente se liberan como partículas virales inmaduras a través de la vía secretora convencional al aparato de Golgi [AG].

Maduración y liberación del virus

En su travesía por el AG, las partículas virales inmaduras sufren modificaciones en las proteínas de su superficie (Perera et al., 2008; Urbanowski et al., 2008; Chatel-Chaix y Bartenschlager, 2014). Un corte proteolítico sobre la proteína prM por una furina -una proteasa celular que reside en la cara trans del AG- da estabilidad a los

homo-trímeros de la proteína E, y genera partículas virales maduras con una superficie lisa capaz de infectar a otras células (Yu et al., 2008). Asimismo, existen cambios post-traduccionales sobre la proteína de envoltura generando la conformación final de la partícula viral con su envoltura glicoprotéica.

Finalmente, el virus es liberado al espacio extracelular donde el pH neutro desprende al péptido pre-M y la proteína E adquiere la conformación final que es reconocida por los diferentes receptores que se encuentran en la superficie de las células que el virus infecta (Elshuber et al., 2003; Jones et al., 2003; Zhang et al., 2003; Kiermayr et al., 2004; Perera et al., 2008; Qi et al et al., 2008; Nayak et al., 2009).

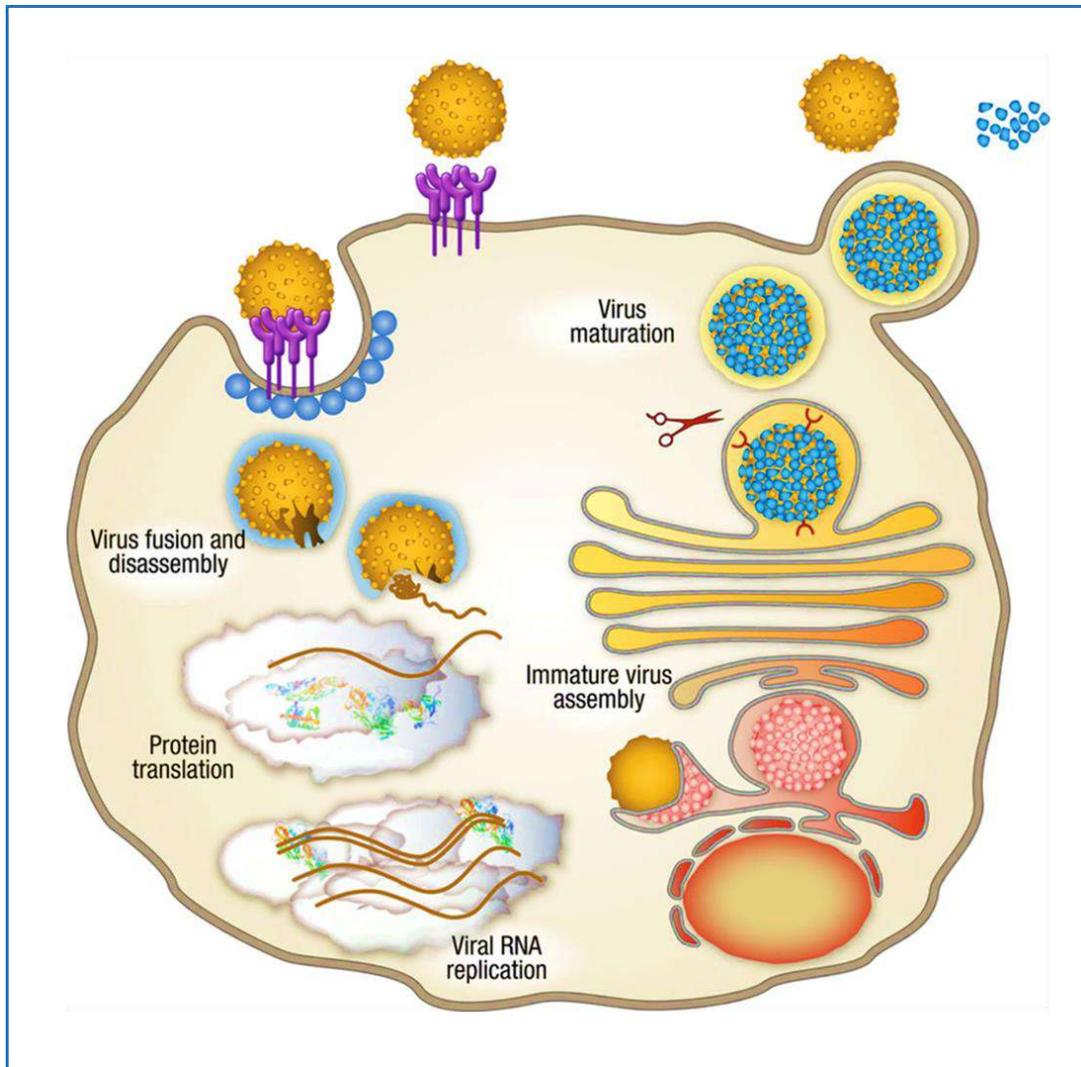


Figura 3. Ciclo de replicación del virus del dengue. En el inicio de la infección, los virus se unen a los receptores de la célula hospedera (Cruz-Oliveira et al., 2015), y estos median su internalización a través de endocitosis. Una vez en el interior, la envoltura viral y la membrana del endosoma se fusionan y el genoma viral se libera en el citoplasma. Instalado en el citoplasma, el genoma viral se traduce en una poliproteína y se fragmenta posteriormente en proteínas estructurales y no estructurales. En el RE, un genoma de dsRNA (-) se sintetiza a partir de un ssRNA (+) y proporciona nuevo RNA viral que se transcribe y replica varias veces para generar múltiples partículas virales. Estas partículas, finalmente se ensamblan y forman estructuras inmaduras que son transportadas a través de la vía secretora al AG -lugar donde las furinas impulsan su maduración-. Por último, el virus maduro se libera por exocitosis de la célula hospedera y se dispone a infectar nuevas células. Imagen tomada de Laughlin et al., 2012.

1.3. *Aedes aegypti*: Insecto vector

El mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) es un importante vector en salud pública debido a su papel como agente transmisor del virus del dengue, así como de otros arbovirus que tienen un impacto negativo en la salud de los seres humanos, entre los que se encuentran: el virus de la fiebre amarilla, el virus chikungunya, el del Zika y el virus Mayaro.

Es un mosquito con amplia distribución geográfica, predominando en las áreas tropicales y subtropicales situadas entre los paralelos 45° Norte y 40° Sur (Forattini 2002) y en las zonas isotermales intermedias a 20°C (Gadelha 1985). Presenta una gran capacidad de adaptación a una amplia variedad de criaderos artificiales debido a su comportamiento antropofílico, lo que posibilita el aumento de su población y, por consiguiente, la aparición de epidemias de dengue en los lugares donde se desarrolla (Lozovei 2001).

Aedes aegypti y otros mosquitos tienen un ciclo de vida complejo -de 8 a 10 días- con cambios dramáticos en su morfología, la función y el hábitat. Los mosquitos hembra ponen sus huevos en las paredes internas y húmedas de los recipientes con agua. Las larvas eclosionan cuando el agua inunda los huevos como resultado de las lluvias o la adición de agua por parte de las personas. En los siguientes días, las larvas se alimentan de microorganismos y materia orgánica particulada; mudando tres veces para poder crecer desde el primero hasta el cuarto estadio. Cuando la larva ha adquirido suficiente energía y tamaño y está en el cuarto estadio, se activa la metamorfosis, transformando la larva en una pupa. Las pupas no se alimentan, simplemente sufren modificaciones en su desarrollo hasta que se forma el cuerpo del mosquito adulto. Los mosquitos adultos son pequeños, y muestran un patrón en blanco y negro debido a la presencia de escamas blancas y plateadas -en un fondo negro- que se distribuye en las patas y otras partes del cuerpo.

Los entornos urbanos le proporcionan numerosos sitios para que lleve a cabo su ciclo biológico, explotando una amplia gama de contenedores para colocar sus huevos y así aumentar en número sus poblaciones.

La distribución de estos mosquitos es impulsada en gran medida por las actividades humanas, muy a menudo se encuentran en viviendas y sus alrededores; alimentándose preferentemente de los seres humanos que habitan en ella (Harrington et al., 2001). Suelen alimentarse varias veces al principio de la mañana y el atardecer, antes de que oscurezca (Scott y Takken, 2012). En cada periodo de alimentación, el mosquito hembra puede picar a distintas personas y poner decenas de huevos durante toda su vida.

Las precipitaciones, temperatura y humedad pueden afectar la supervivencia, reproducción y desarrollo de los mosquitos y pueden influir en la presencia, abundancia y la productividad de los sitios de reproducción, pero la preferencia de esta especie por los contenedores de agua artificial -como se mencionó anteriormente- significa que no tiene que depender de la lluvia para los sitios de desarrollo larvario. Junto con su preferencia por la alimentación y el descanso en interiores, estos aspectos hacen que esta especie sea menos susceptible a los efectos de los factores climáticos que podrían influir en su distribución. Además, las temperaturas más altas reducen el tiempo requerido para que el virus se replique y se disemine en el mosquito vector. Si el mosquito se vuelve infectivo más rápido porque las temperaturas son más cálidas, entonces tiene una mayor probabilidad de infectar a un ser humano antes de que muera.

Existe una adaptación muy importante de los mosquitos que transmiten el dengue que hace que el control de sus poblaciones sea una tarea difícil de ejecutar. Sus huevos pueden soportar la desecación durante varios meses (Juliano y Lounibos, 2005), lo que significa que incluso si todas las larvas, pupas y adultos se eliminaran en algún momento, la repoblación ocurriría tan pronto como los huevos entrarán en contacto con el agua. La eliminación de recipientes no utilizados, así como la protección de estos mismos con cubiertas herméticas reduciría en gran medida el riesgo de infecciones por dengue en asentamientos humanos (Jansen y Beebe, 2010).

1.3.1. Ciclo de transmisión: Interacción virus-vector

Los cuatro serotipos del DENV se mantienen en la naturaleza en dos ciclos de transmisión: (1) el ciclo selvático en el que participan primates y mosquitos arbóreos del género *Aedes* (Vasilaski et al., 2011) y (2) el ciclo urbano -de mayor importancia epidemiológica- que involucra al ser humano como único hospedero definitivo y a mosquitos *Aedes aegypti* (Whitehead et al., 2007).

La infección en el mosquito (Figura 4) inicia cuando este se alimenta de un hospedero virémico e ingiere junto con la sangre las partículas virales. Una vez en la luz del intestino, las partículas virales inician el reconocimiento de la célula epitelial y la infectan. El virus se replica, produce la progenie viral y se propaga rápidamente a otros órganos como el cuerpo graso, los ovarios y el tejido nervioso; todo esto a través del sistema traqueal, el muscular y la hemolinfa (Salazar et al., 2007). Por último, el virus infecta las glándulas salivales en donde se replica nuevamente y permanece ahí hasta ser inoculado en un hospedero vertebrado sano. La propagación del virus hacia las glándulas salivales es esencial para que el mosquito sea competente para la transmisión a otros huéspedes vertebrados (Bennett et al., 2005). La infección por el virus del dengue no parece tener efectos apreciables en el metabolismo de las células o el mosquito propio -el cual permanece infectado el resto de su vida- sin embargo, es posible documentar alteraciones en la composición de ácidos grasos y proteínas en el sobrenadante de células de mosquito infectadas con DENV 2 (Kuno et al., 1984).

Las características genéticas de cada uno de los serotipos del virus del dengue, la concentración o título viral, la cantidad de sangre que se ingiere o factores ambientales como la temperatura y la humedad pueden influir en la propagación del virus dentro del mosquito, período conocido como incubación extrínseca; afectado de esta forma el ciclo de transmisión. La caracterización de estos factores permite comprender aún más la compleja interacción que se establece entre el virus y el vector; proporcionando de esta manera, una herramienta poderosa para el diseño e implementación de estrategias encaminadas a controlar las poblaciones de este importante vector.

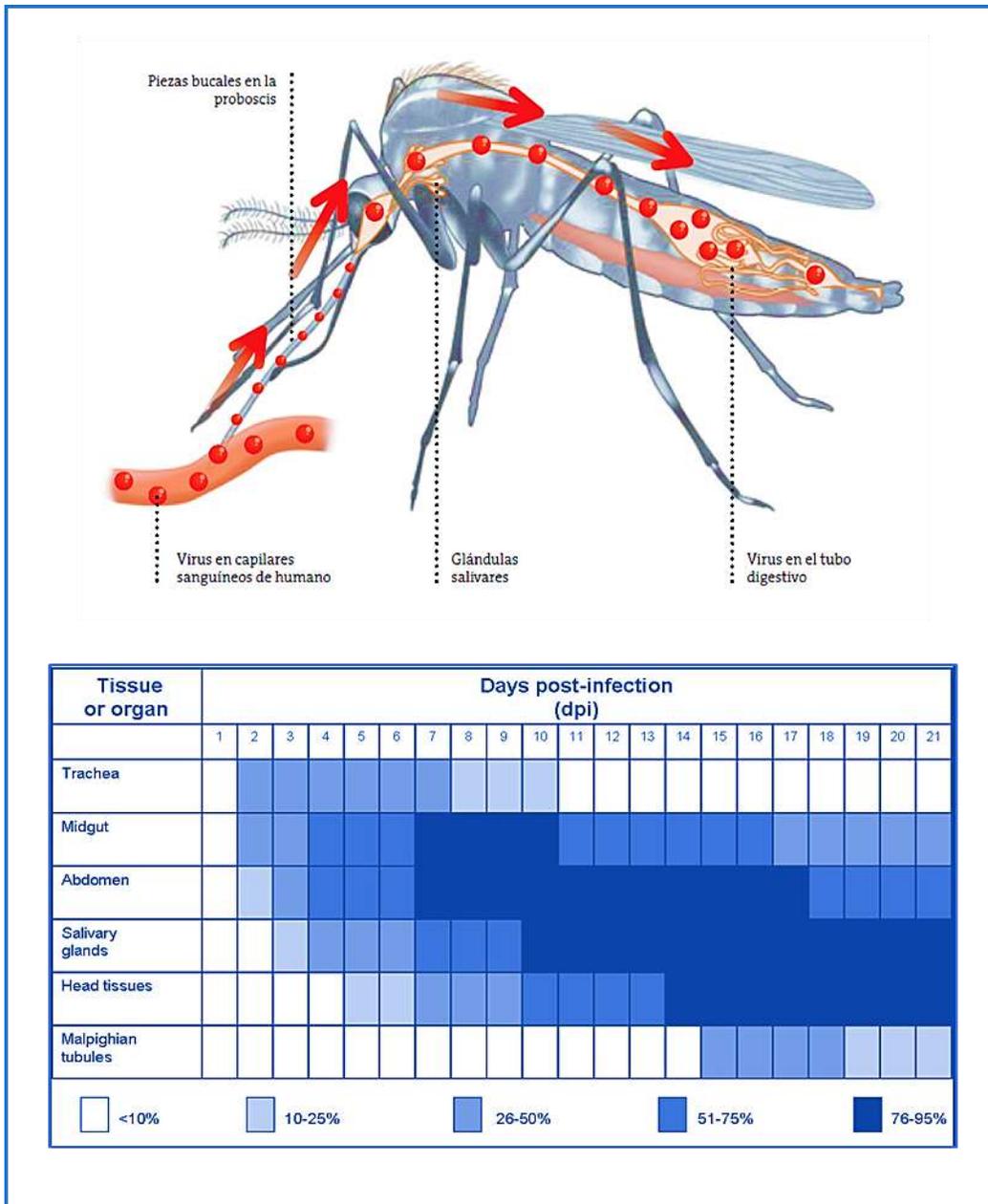


Figura 4. Infección por virus del dengue en el mosquito vector. La imagen muestra la travesía del virus del dengue en el interior del mosquito *Aedes aegypti* una vez que este se ha alimentado de un hospedero vertebrado infectado, así como la tasa de infección -representada en una escala azul- en diferentes órganos y tejidos a través del tiempo. En el mosquito, el virus del dengue necesita superar varias barreras anatómicas e inmunológicas para alcanzar títulos suficientemente elevados en las glándulas salivares y así poder llevar a cabo la transmisión a un hospedero vertebrado sano. Imagen modificada. Salazar et al., 2007; https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2018-10/0000001045cnt-2013-09_participacion-social-prevencion-dengue.pdf

1.4. Respuesta inmune antiviral

En el ser humano, la infección por el virus del dengue puede causar una enfermedad severa mientras que en los mosquitos -que actúan como vectores- la infección parece no perjudicar el comportamiento o vida del insecto; lo que indica que han desarrollado mecanismos eficaces para tolerar la infección persistente y restringir la replicación viral a niveles que no comprometen su integridad (Lambrechts y Scott, 2009).

A diferencia del sistema inmunitario de los vertebrados, los mosquitos no poseen una respuesta inmune adaptativa basada en la expansión clonal de poblaciones linfocitarias (Abbas et al., 2021), y dependen únicamente de la inmunidad innata para combatir una infección viral. La infección viral desencadena la activación de vías de señalización intracelular en el mosquito y conduce a la transcripción controlada de genes relacionados con la inmunidad antiviral (Lee et al., 2019).

El sistema inmunitario innato de los mosquitos consta de dos respuestas estrechamente relacionadas: las respuestas de defensa celular y las respuestas de defensa humoral. Estas dos respuestas actúan en conjunto para proteger a los mosquitos contra una amplia variedad de patógenos, incluidos los virus. Ante una infección con DENV, hay una activación complementaria de más de una de estas respuestas para hacer frente a la replicación y propagación viral en los tejidos del insecto vector.

Mecanismos de defensa humoral

Vía Toll

La vía Toll se describió por primera vez en *Drosophila*, y es conocida por su papel en la inmunidad innata contra patógenos, como hongos y bacterias Gram-positivas (Duneau et al., 2017). La activación de esta vía conduce a una cascada de eventos que resultan en la fosforilación y degradación del regulador negativo Cactus, que es un inhibidor del factor de transcripción Rel1 [miembro de la familia de proteínas Nf- κ b]. La degradación de Cactus permite la translocación de Rel1 al núcleo y la

posterior transcripción de genes efectores de péptidos antimicrobianos [PAMs] como diptericina y cecropina entre otros (DeLotto y DeLotto, 1998; Michel et al., 2001).

En mosquitos *Aedes aegypti*, se ha encontrado que la infección por DENV activa la transcripción de genes que codifican para los principales componentes de la vía Toll -como son Spatzle, Toll y Rel1A-; sugiriendo que esta vía participa en la defensa anti-DENV, inhibiendo la replicación viral (Xi et al., 2008; Sim et al., 2012). Esta función anti-DENV de la vía Toll ha sido respaldada por el silenciamiento de sus reguladores negativos y positivos. El silenciamiento de Cactus disminuye cuatro veces los títulos de DENV en el intestino medio, mientras que el silenciamiento de MyD88 aumenta significativamente los títulos virales (Xi et al., 2008).

Vía Imd

La vía de inmunodeficiencia [Imd] es activada por el reconocimiento de peptidoglicanos [PGN]; un componente de la pared celular de bacterias gramnegativas que se unen a las proteínas (receptores) de reconocimiento a PGN [PGPRs]. La unión a estos receptores resulta en su dimerización y en el reclutamiento de la proteína Imd, que a su vez recluta a la proteína adaptadora dFadd [Drosophila Fas-Associated protein with death domain] y a la caspasa Dredd [caspasa death-related ced-3/Nedd2-like-protein]. La proteína Dredd procesa a la proteína Imd en el extremo amino terminal, lo que permite su ubiquitinación y subsecuente activación. Más tarde, las cadenas de ubiquitina en la proteína Imd reclutan y activan al complejo Tab2 que es el responsable de la fosforilación y activación de los dos ejes de la vía Imd: el eje JNK y el eje IKK/Rel. Esta activación provoca la fosforilación de IKK y la fosforilación y procesamiento de Rel por Dredd, generando la translocación de Rel al núcleo para activar la transcripción de PAMs como diptericina, cecropina y defensina (Zhang et al., 2017; Lee et al., 2019).

Un estudio ha demostrado que el agotamiento de las transcripciones de la vía Imd en una cepa refractaria a DENV aumenta significativamente los títulos virales en el intestino medio de los mosquitos (Sim et al., 2013) sugiriendo que esta vía induce mecanismos antivirales contra DENV (Surasombatpattana et al., 2011).

Vía Jak-Stat

La activación de la vía Jak-Stat inicia por la unión extracelular del ligando Upd [Unpaired] con el receptor Dome [Domeless], un homólogo del receptor tipo 1 de citocinas (Brown et al., 2001). Tras la unión con el ligando, el receptor sufre un cambio conformacional que conduce a la autofosforilación de la proteína Hop [Hopscotch] que es una Jak cinasa. Una vez activada, la proteína Hop fosforila a Dome y forma sitios de acoplamiento para las Stat citoplasmáticas. El reclutamiento de Stat por el complejo Dome/Hop inducirá la fosforilación y dimerización de Stat, el cual se translocará al núcleo para activar la transcripción de genes específicos.

A través de estudios funcionales, se ha demostrado que la vía Jak-Stat media una mayor resistencia a DENV y ZIKV en mosquitos *Aedes aegypti* (Ramirez y Dimopoulos, 2010). El silenciamiento de dos reguladores de la vía Jak-Stat -como Hop y Dome- en mosquitos *Aedes aegypti* produce un incremento en el título viral desde el 3^{er} al 7^o día post-infección; lo cual sugiere la participación de esta vía como mecanismo antiviral (Xi et al., 2008; Souza-Neto et al., 2009). Por otro lado, mosquitos genéticamente modificados que sobre expresan Dome y Hop -en el cuerpo graso- pueden limitar la infección en el intestino medio y de forma sistémica en otros órganos (Jupatanakul et al., 2017).

Vía de interferencia de RNA

El RNA de interferencia (iRNA) es el principal mecanismo de defensa antiviral en los insectos para controlar la infección por virus a través de la degradación del RNA, también conocido como silenciamiento del RNA. El evento clave en la vía del iRNA es la producción de RNAs pequeños a partir del RNA viral de doble cadena (dsRNA) (Fire et al., 1998).

La vía es activada por la presencia en el citoplasma de RNA de doble cadena [dsRNA], que es un elemento intermediario de la replicación viral. Una vez captados por las células, los dsRNA se escinden en pequeños fragmentos de doble cadena interferentes [siRNA] -de 21 a 23 nucleótidos- por RNAsas del hospedero como Dicer2 y R2D2 (Blair y Olson, 2015). La unión de estos fragmentos con un complejo

silenciador inducido por RNA [RISC] causa la degradación de una de las cadenas y el complejo resultante con un pequeño tramo de RNA media la degradación específica del mRNA viral -inhibiendo la síntesis de proteínas- (Deerberget al., 2013).

El silenciamiento de los componentes centrales de esta vía como Dicer2, R2D2 y Ago2 da como resultado una replicación incontrolada de arbovirus en mosquitos y un periodo de incubación extrínseco más corto (Khoo et al., 2010) y a pesar de que no protege completamente contra la infección por DENV (Goic, et al., 2016), si modula la replicación viral por lo que se presume que el virus se ha adaptado conjuntamente a la respuesta del vector en formas que aún no están totalmente esclarecidas. Hasta el momento, estos hallazgos indican que la vía del RNA interferente desempeña un papel antiviral importante cuando el virus del dengue permanece en el interior del mosquito (Sanchez-Vargas et al., 2009).

Vía de señalización Delta-Notch

Delta-Notch es un sistema de señalización celular altamente conservado, que juega un papel crucial en el desarrollo embrionario, el mantenimiento de las células madre y la renovación del tejido adulto (Kopan y Ilagan, 2009). Recientemente, se ha informado de un nuevo papel de esta vía en la inmunidad innata antiviral, al limitar la replicación del virus del dengue en mosquitos *Ae. aegypti* (Serrato-Salas et al., 2018).

La activación de esta vía de señalización depende de la unión del ligando Delta al receptor Notch; liberando un fragmento activo conocido como dominio intracelular Notch (NICD), que ingresa al núcleo para activar genes específicos como: Delta, Notch y Hindsight (Sun et al., 2005). Aunque se desconoce el mecanismo exacto de cómo esta vía limita la replicación de DENV, se ha demostrado que su activación induce un mecanismo en el que las células se someten a múltiples rondas de replicación de DNA sin mitosis para aumentar drásticamente el contenido de DNA genómico en las células. Serrato-Salas et al.,

2018; sugieren que este aumento en la síntesis de DNA incrementa el número de transcripciones de genes que participan en el control de la propagación viral.

Mecanismos de defensa celular

La respuesta de defensa celular en los mosquitos incluye fagocitosis, nodulación y encapsulación de patógenos por hemocitos (Satyavathi y Nagaraju, 2014). Los hemocitos son células que circulan dentro de la hemolinfa del insecto y son permisivos a la infección viral, incluido DENV (Salazar et al., 2007). Pueden provocar respuestas humorales activando vías de señalización, como se mencionó anteriormente, y sus respuestas efectoras conducen a la síntesis y secreción de moléculas solubles como AMP y componentes de la cascada de fenoloxidasa en la hemolinfa para controlar la infección contra patógenos invasores (Parikh et al., 2009; Eleftherianos y Revenis, 2011).

Al igual que los hemocitos, las células epiteliales del intestino medio del mosquito juegan un papel importante en la inmunidad innata antiviral ya que constituyen la primera línea de defensa contra muchos patógenos que se adquieren durante la alimentación sanguínea.

1.4.1. Especificidad de la respuesta inmune

En los vertebrados, la inmunidad innata y la adaptativa se distinguen comúnmente sobre la base de sus niveles de especificidad, con los receptores de antígenos del sistema inmunitario adaptativo mediando respuestas altamente específicas, en contraste con el reconocimiento más promiscuo y, por lo tanto, menos específico de patógenos por parte de receptores del sistema inmune innato (Vivier y Malissen, 2005).

Los receptores inmunitarios innatos de los invertebrados reconocen un número limitado de moléculas, algunas de las cuales se conservan evolutivamente y son compartidas por muchos agentes infecciosos (como lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico peptidoglicanos, CpG no metilados, oligosacáridos con manosas

terminales y RNA de doble cadena (Janeway y Medzhitov, 2002; Beutler, 2003). Estos receptores están codificados en la línea germinal y aunque su expresión puede estar restringida a algunos tipos celulares, no se distribuyen clonalmente. Muchos de estos sensores de reconocimiento innato se denominan receptores de reconocimiento de patrones y se expresan en la superficie, vesículas fagocíticas, y el citoplasma de varias células donde inician la transducción de señales que promueven la resistencia a determinada infección (Medzhitov, et al., 1997).

2. ANTECEDENTES

2.1. Inmunidad innata en insectos

El sistema inmunitario innato evolucionó temprano en la vida de organismos multicelulares, mientras que el sistema inmunitario adaptativo evolucionó del antepasado más cercano de los vertebrados (Cooper y Alder, 2006). En insectos y otros invertebrados el sistema inmune innato no solo combate una amplia variedad de agentes patógenos, sino que está involucrado en procesos complejos como la cicatrización de heridas, las respuestas al estrés y el control de poblaciones simbiotes bacterianas (Beckage, 2008).

La versatilidad observada en la respuesta inmune innata de los insectos se basa en gran parte a su capacidad para colonizar diversos nichos ecológicos mientras se defienden de los patógenos que habitan esos nichos (Loker et al., 2004). De hecho, los genes de inmunidad innata en general evolucionan a un ritmo más rápido que el genoma en conjunto (Lazzaro y Little, 2009), debido al flujo continuo de nuevos agentes patógenos que generan presiones selectivas persistentes (Brucker et al., 2012).

2.1.1. Inmunidad innata en mosquitos

En la naturaleza, los mosquitos responden a una amplia variedad de infecciones empleando barreras tanto físicas como fisiológicas para resistir la entrada de agentes patógenos. Sin embargo, si el patógeno logra entrar en el insecto, éste monta una respuesta inmune innata para limitar su propagación.

La mayoría de los patógenos ingresan a los mosquitos a través del consumo de sangre, que es una necesidad fisiológica de los mosquitos hembra para el desarrollo de sus huevos (Zhou et al., 2007). Al alimentarse con sangre, los patógenos pasan a la luz del intestino medio y se establecen dentro del mosquito (Abraham y Jacobs-Lorena, 2004).

La alimentación sanguínea por si sola provoca una respuesta inmune en el mosquito; sin embargo, se ha observado que si la sangre se encuentra infectada hay un aumento significativo de moléculas efectoras inmunitarias (Bonizzoni et al., 2011; Fukutani et al., 2017). Específicamente, existe una regulación por tejido de estas moléculas efectoras para minimizar el establecimiento de los patógenos. Al mismo tiempo, es esencial que los mosquitos controlen y minimicen la activación inmunológica y mantengan una inmunidad relativamente baja para la supervivencia y el mantenimiento de microbios comensales para mantener un equilibrio (Kumar et al., 2018).

2.2. Priming inmunológico

Durante mucho tiempo, se ha argumentado en el campo de la inmunología que los invertebrados son organismos incapaces de generar memoria inmunológica (Klein, 1989; Cooper, 1992); debido a que no cuentan con una maquinaria molecular capaz de generar memoria a través de un sistema humoral basado en la generación de anticuerpos y expansión clonal de poblaciones linfocitarias -como ocurre con los organismos vertebrados- (Janeway et al., 2001; Murphy et al., 2007; Schmid-Hempel, 2011).

Sin embargo, investigaciones recientes en el campo de la inmunología comparada han evidenciado en algunos grupos de invertebrados que la exposición previa a parásitos y patógenos en estos organismos facilita una mayor protección durante un segundo encuentro con esos mismos agentes (Lemaitre et al., 1997; Brey, 1998; Kurtz y Franz, 2003; Rolff y Siva-Jothy, 2003; Zhang et al., 2004). Este aumento en la protección contra infecciones ha sido denominado “priming inmunológico”, y su efecto en diferentes taxones de invertebrados -incluyendo a los insectos- ha sido evaluado (Kurtz, 2005; Contreras-Garduño et al., 2016; Sheehan et al., 2020; Mohammadie Kojour et al., 2022; Lanz-Mendoza y Contreras-Garduño, 2022).

El priming es un fenómeno inmunológico que tiene un efecto protector (Moret y Siva-Jothy, 2003) y específico (Pham et al., 2007) en aquellos organismos que han enfrentado previamente al mismo agente patógeno (Kurtz, 2005). Este mecanismo le permite al organismo procesar la información del primer encuentro con dicho agente para que pueda ser empleada más adelante; así las respuestas efectoras se incrementan en términos de rapidez, especificidad y eficiencia durante un segundo encuentro (Schulenburg et al., 2007).

La inducción del priming inmunológico en los invertebrados implica un solo desafío inmunitario (Contreras-Garduño et al., 2016; Ferro et al., 2019). El priming solo es inducido por estímulos bióticos y abióticos (Kelly y O'Neill, 2015) y es fundamental en la investigación experimental para evaluar la memoria inmune innata (Little y Kraaijeveld, 2004; Contreras-Garduño et al., 2016), así como para comparar con algunas respuestas observadas en la inmunidad adaptativa de los vertebrados.

2.2.1. Priming inmunológico en mosquitos *Aedes aegypti*

Con el objetivo de poder interrumpir la transmisión del virus dengue en mosquitos *Aedes aegypti*, muchas estrategias se ha enfocado en evaluar el efecto del priming inmunológico durante la infección de estos insectos para poder manipular la respuesta inmune y por ende, limitar la infección por debajo del umbral mínimo necesario de transmisión hacia el ser humano.

En mosquitos *Aedes aegypti*, se ha observado que un reto previo -con un agente no letal- modifica su respuesta inmune contra el mismo microorganismo; generando una respuesta antimicrobiana mejorada (Vargas et al., 2016). Esta observación proporciona evidencia de que ante un encuentro previo con un agente patógeno, el mosquito puede montar una respuesta eficiente para hacer frente a la presencia de este organismo en un segundo encuentro. Bajo este contexto, se espera que tras una infección previa con el virus del dengue los mosquitos *Aedes aegypti* respondan de manera más eficiente para limitar la replicación viral.

Experimentalmente, mosquitos *Aedes aegypti* han sido alimentados con virus dengue 2 inactivado por luz ultravioleta y siete días después de esta alimentación retados nuevamente con DENV-2, pero en su estado activo. Posteriormente, se analizó la intensidad de la infección a través de la detección de partículas virales en el intestino medio y la carcasa del mosquito. Los resultados de este experimento demostraron que los mosquitos con una infección previa por DENV-2 presentaban un número reducido de partículas virales infecciosas, tanto en el intestino medio como en la carcasa -a diferencia del grupo control, alimentado con sangre no infectada- (Serrato-Salas et al., 2018).

A la par del experimento anterior, se evaluó también la actividad transcripcional del virus del dengue a través de la expresión de la proteína no estructural NS1 a los cinco y siete días después de la infección con el DENV-2 activo. Las conclusiones a las que se llegaron después de analizar los resultados indicaron que la alimentación previa con el agente patógeno afectó la actividad transcripcional del propio virus en un nuevo encuentro; esto se dedujo al observar una menor expresión de la proteína NS1 a los cinco y siete días después de la alimentación en mosquitos que tuvieron un encuentro previo con el agente patógeno a diferencia del grupo control (Serrato-Salas et al., 2018).

La generación de una respuesta inmune mejorada en mosquitos *Aedes aegypti* también ha sido evaluada desde la etapa de ontogenia; induciendo una infección en el estado larval para mejorar la respuesta antiviral del mosquito ante un segundo encuentro con el virus del dengue en el estado adulto (Vargas et al., 2020). Actualmente, son pocos los estudios que han evaluado este fenómeno inmunológico en las primeras etapas de desarrollo de los insectos. Sin embargo, nuestro grupo ha dado los primeros pasos y ha iniciado evaluando el efecto del priming inmunológico en mosquitos adultos *Aedes aegypti* que tuvieron un encuentro previo con el virus dengue desde la etapa larval. Los mosquitos con priming inmunológico -desde el estado larval- controlaron de forma más eficiente la infección por DENV reduciendo la carga viral en comparación con el grupo de moscos que no tuvieron un encuentro con el patógeno.

Además de la carga viral, la respuesta inmune antiviral -de los mosquitos con priming desde el estado larval- se evaluó a través de la expresión relativa de componentes clave que participan en la vía del RNA interferente. Los resultados de estos experimentos mostraron una respuesta inmune antiviral mejorada en el grupo de mosquitos adultos que en la etapa de larva tuvieron contacto con el DENV inactivo, a diferencia de los moscos del grupo control que en el estado larval no tuvieron contacto previo con este agente patógeno (Vargas et al., 2020).

Con esta serie de experimentos, nuestro grupo de investigación ha evidenciado que el priming inmunológico les confiere a los mosquitos *Aedes aegypti* respuestas inmunes eficientes, aumentadas y específicas que se conservan tras una exposición previa al virus del dengue. Además de que la infección viral puede verse afectada por una respuesta inmune mejorada en el mosquito vector.

3.- JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune juega un papel muy importante en la adquisición, mantenimiento y transmisión del virus del dengue en el mosquito *Aedes aegypti*; y por lo tanto, se relaciona con la capacidad vectorial del insecto para diseminar el virus y por ende la enfermedad en los seres humanos.

En los mosquitos, la inmunidad innata limita la propagación viral generando respuestas humorales y celulares que se activan en presencia del agente patógeno. A pesar de ello, se genera tolerancia a la infección por el virus del dengue; debido a que se mantiene en el insecto a niveles que no comprometen su integridad.

El priming inmunológico es un fenómeno que puede potenciar los mecanismos de defensa del insecto y romper la tolerancia a la infección, por ello resulta relevante conocer con mayor profundidad cada uno de los atributos que operan durante su funcionamiento; entre los que se encuentra la especificidad.

La protección que se observa en este fenómeno suele estar asociada con el reconocimiento específico del agente patógeno. No obstante, en una infección por dengue se conoce que existen cuatro variantes genéticas o serotipos que pueden estar interactuando con el mosquito vector. En los vertebrados, la infección por dengue, genera respuestas específicas para cada serotipo, pero en el mosquito la información que se tiene al respecto es limitada o casi nula.

Es por esto que en la presente investigación, se pretende abordar en el contexto de una infección por dengue la especificidad del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* cuando interactúa con dos serotipos diferentes del virus dengue. El conocimiento generado en este trabajo contribuirá sustancialmente a la discusión en torno a la visión que se tiene de este fenómeno con respecto a la respuesta adaptativa de los vertebrados.

4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La especificidad del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* se ve alterada durante un reto heterólogo con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue?

4.1- HIPÓTESIS

La especificidad del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* no se altera durante un reto heterólogo con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.

5.- OBJETIVOS

- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la especificidad del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* durante un reto heterólogo con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.

- OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir una respuesta inmune mejorada en mosquitos *Aedes aegypti* con dos serotipos del virus del dengue.
- Analizar la infección por DENV en mosquitos *Aedes aegypti* que han sido retados de forma heteróloga con dos de las cuatro variantes genéticas del virus del dengue.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Crianza de mosquitos *Aedes aegypti*

Mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa Rockefeller -que es susceptible a la infección por el virus del dengue- fueron empleados en esta investigación. Recién emergidos, los mosquitos adultos fueron mantenidos en el insectario del Instituto Nacional de Salud Pública a una temperatura que oscila los $28 \pm 1^\circ\text{C}$; con una humedad relativa del 65-85% y bajo un fotoperiodo de 12 h luz / 12 h oscuridad. Durante esos días, los mosquitos fueron alimentados ad libitum con pequeñas torundas de algodón empapadas con una solución de sacarosa al 10%. Los mosquitos fueron alimentados con sangre de conejo con heparina para la producción de huevos y continuar así con el mantenimiento de la colonia. Las condiciones de alimentación y cuidados para larvas de mosquitos se muestran en el apéndice 1.

6.2. Cultivo de líneas celulares

Para los ensayos de propagación viral, se cultivaron las líneas celulares C6/36 y LLC-MK2 respectivamente.

C6/36: Células epiteliales provenientes de mosquitos *Aedes albopictus* se propagaron en 4 ml. de medio Schneider (Caisoon labs) suplementado con suero fetal bovino al 10% en frascos de cultivo de 25 cm^2 y se dejaron incubando a 28°C hasta que se obtuvo una confluencia del 80% para su próxima infección o pase celular. Para realizar el pase celular, se retiró por completo el medio en el que se encontraban y posteriormente fueron lavadas con 2 ml. de medio Schneider -con el fin de retirar el debris celular y las células que no se adhirieron a la placa-. Tras el lavado, se añadieron 8 ml. de medio Schneider -suplementado con suero fetal bovino al 10%- y se realizó una agitación con golpes ligeros en la base del frasco para desprender a las células. Estas células no se adhieren fuertemente al sustrato; por lo que con un desprendimiento mecánico fue suficiente para despegarlas. Finalmente, se tomaron 4 ml. de la suspensión del frasco de cultivo y se transfirieron a uno nuevo, donde se mantuvieron en una incubadora a 28°C hasta que se obtuvo la confluencia adecuada que se requiere para los ensayos de infección.

LLC-MK2: Células epiteliales provenientes de riñón de monos *Rhesus* se propagaron en 4 ml. de medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10% en frascos de cultivo de 25 cm² y se dejaron incubando a 37°C con 5% de CO₂ y 5% de O₂ hasta que se obtuvo una confluencia del 80% para su próxima infección o pase celular. Partiendo de un cultivo celular que necesita ser resembrado, se retiró por completo el medio y se realizó un lavado con 2 ml. de medio DMEM para retirar el debris celular. Posteriormente, se añadió 1 ml. de tripsina temperada (Gibco) verificando que cubriera toda la superficie del frasco de cultivo y se dejó incubando por 15 minutos a 37°C. La tripsina resulta tóxica para las células si se prolonga el tiempo de incubación, por lo que una vez transcurrido el tiempo se diluyó inmediatamente con 4 ml. de medio DMEM. Por último, se tomaron 2.5 ml. de la suspensión de células y se colocaron en un nuevo frasco de cultivo junto con 1.5 ml. de medio DMEM -suplementado con suero fetal bovino al 10%- . Las cajas permanecieron en incubación hasta que las células alcanzaron la confluencia deseada y fueron útiles para el ensayo de infección.

6.3. Propagación viral

Los serotipos 2 y 4 del virus del dengue fueron obtenidos del *stock* viral del Laboratorio de Infección e Inmunidad del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) a cargo del Dr. Humberto Lanz Mendoza. Los virus fueron propagados de manera cíclica en células C6/36 y células LLC-MK2. Las células C6/36 se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² con medio Schneider suplementado con aminoácidos no esenciales, vitaminas, 10% de suero fetal bovino, penicilina y estreptomina. Posteriormente, las células se dejaron incubando durante 5 días a 28°C hasta que se obtuvo una monocapa confluyente del 80%. Una vez que se alcanzó este porcentaje, las células se lavaron con PBS a pH 7.4 y se inocularon -de manera independiente- con 500 µl. del *stock* viral de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue. Tras la inoculación, las células se dejaron nuevamente incubando por un periodo de 5-7 días a 28°C -tiempo suficiente para observar el efecto citopático ocasionado por el virus en cada uno de los cultivos celulares-. El sobrenadante de estos cultivos fue colectado en microtubos de 1.5 ml. y posteriormente fueron centrifugados durante 15 minutos a 3000 G. El contenido

centrifugado fue tomado y colocado en un nuevo microtubo 1.5 ml., donde fue almacenado finalmente a una temperatura de -70°C.

El procedimiento anterior fue empleado de la misma forma para infectar con dengue células LLC-MK2 -provenientes de riñón de monos *Rhesus*-.

6.4. Inactivación de partículas virales

Los serotipos 2 y 4 -del virus del dengue- fueron inactivados mediante luz ultravioleta [UV]. En una cámara Lab-Tek™ -previamente esterilizada- 1 ml. de cada uno de los stocks virales fue colocado de manera separada, e irradiado durante 3 horas bajo luz UV. Al término de la irradiación, se filtraron en unidades de 0.20 µm. y se colectaron para su posterior uso en microtubos de 1.5 ml.

6.5. Infección de mosquitos *Aedes aegypti*

Para las infecciones, se emplearon 600 mosquitos hembra *Aedes aegypti* -cepa Rockefeller- de 5 días post-emergencia. Los mosquitos inicialmente fueron separados en seis grupos -con 100 individuos cada uno- y se alimentaron de forma artificial durante 30 minutos a 37°C a través de un alimentador de vidrio que tiene acoplada una membrana de papel parafilm. Tras concluir el tiempo de alimentación, se realizó un tamizaje en el que los mosquitos que no se alimentaron fueron separados de cada uno de los grupos. Esta acción nos permitió tener certeza de que el 100% de los mosquitos restantes se alimentó de acuerdo con las condiciones para cada grupo que se enlistan a continuación.

Grupo 1. Control DENV2: Mosquitos alimentados con sangre de conejo no infectada.

Grupo 2. Control DENV4: Mosquitos alimentados con sangre de conejo no infectada.

Grupo 3. Priming Homólogo DENV2: Mosquitos alimentados con DENV-2 inactivado por luz UV.

Grupo 4. Priming Homólogo DENV4: Mosquitos alimentados con DENV-4 inactivado por luz UV.

Grupo 5. Priming Heterólogo DENV2: Mosquitos alimentados con DENV-2 inactivado por luz UV.

Grupo 6. Priming Heterólogo DENV4: Mosquitos alimentados con DENV-4 inactivado por luz UV.

La solución vehículo para la infección de los mosquitos -del grupo control- consistió en 1 ml. de sangre de conejo con heparina [SCH], mientras que para los mosquitos del grupo priming homólogo y priming heterólogo consistió en 1 ml. de una suspensión -en proporción 1:1- de SCH+DENV-2 o DENV-4 según sea el caso; ambos inactivados con luz UV. Una vez alimentados, los mosquitos de cada uno de los grupos se colocaron nuevamente en condiciones controladas de insectario durante 7 días hasta ser alimentados nuevamente con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue en estado activo. Las condiciones particulares de esta nueva alimentación en cada uno de los grupos fueron las siguientes:

Grupo 1. Control DENV2: Mosquitos alimentados con DENV-2 activo.

Grupo 2. Control DENV4: Mosquitos alimentados con DENV-4 activo.

Grupo 3. Priming Homólogo DENV2: Mosquitos alimentados con DENV-2 activo.

Grupo 4. Priming Homólogo DENV4: Mosquitos alimentados con DENV-4 activo.

Grupo 5. Priming Heterólogo DENV2: Mosquitos alimentados con DENV-4 activo.

Grupo 6. Priming Heterólogo DENV4: Mosquitos alimentados con DENV-2 activo.

Tras finalizar la alimentación, se separaron otra vez aquellos mosquitos que no se alimentaron. Esto nos garantizó que cada uno de los mosquitos restantes en los diferentes grupos ingirió la mezcla de sangre con cada uno de los serotipos del virus del dengue. La figura 5 muestra gráficamente el diseño experimental que se llevó a cabo para realizar la infección en los mosquitos *Aedes aegypti*.

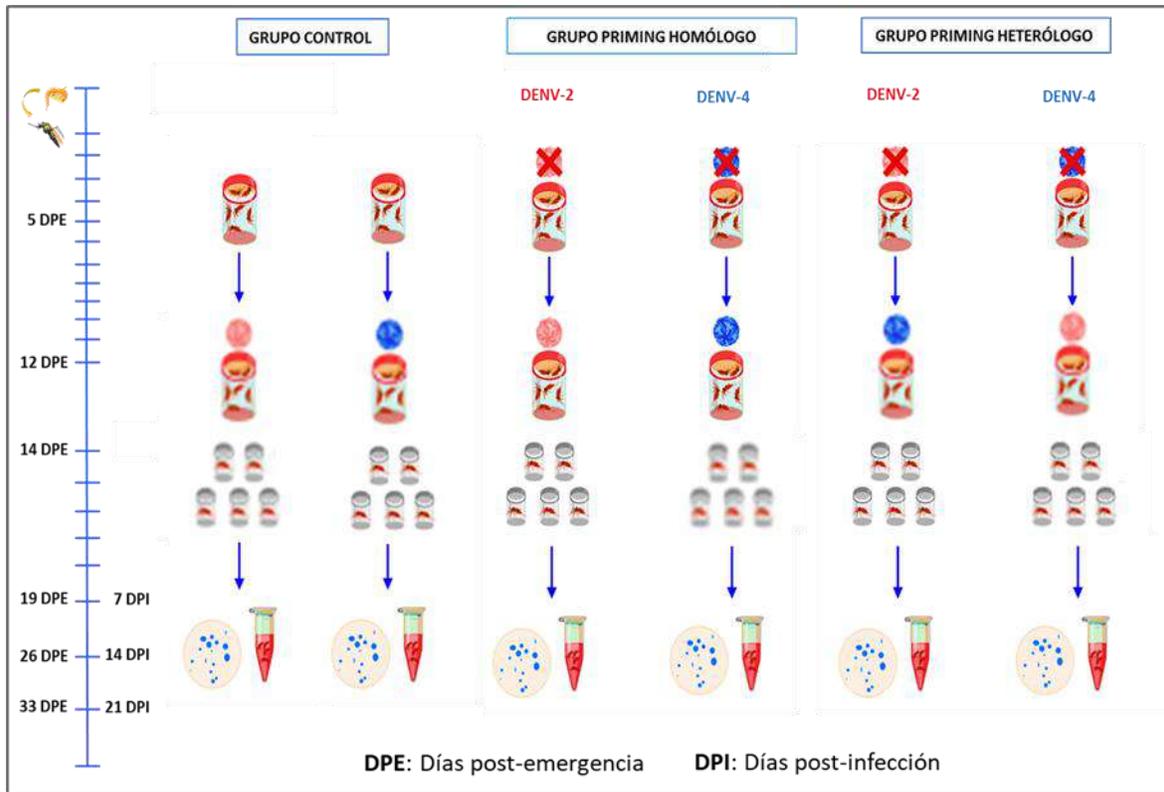


Figura 5. Diseño experimental de infecciones homólogas y heterólogas en mosquitos *Aedes aegypti*. Mosquitos *Aedes aegypti* inicialmente fueron separados en seis grupos -con 100 individuos cada uno- y se alimentaron de forma artificial durante 30 min. a través de un alimentador de vidrio. La solución vehículo para la infección de los mosquitos -del grupo control- consistió en 1 ml. de sangre de conejo heparinizada [SCH], mientras que para los mosquitos del grupo priming homólogo y priming heterólogo consistió en 1 ml. de una suspensión -en proporción 1:1- de SCH+DENV-2 o DENV-4 según sea el caso; ambos inactivados por luz UV. Esta primera alimentación -a los 5 días post-emergencia de los mosquitos- con cada una de las diferentes condiciones se denominó como “inducción del priming inmunológico” y consistió en la exposición de los mosquitos a partículas virales inactivadas con luz UV. Una semana después de haber realizado el priming, cuando la edad de los mosquitos era de 12 días post-emergencia se realizó nuevamente una alimentación que consistió en la exposición a partículas virales -serotipos 2 y 4- en su forma activa, es decir que no habían pasado por un proceso de inactivación con luz UV. Esta parte del protocolo experimental, se denominó como “reto inmunológico”. Finalmente, los mosquitos se mantuvieron en condiciones controladas de insectario durante un mes para realizar el seguimiento de la infección por DENV mediante la colecta de excretas a los 7, 14 y 21 días post-reto inmunológico.

6.6. Aislamiento de RNA viral en excretas de mosquitos

Para analizar la infección por el virus del dengue en los mosquitos, se implementó el protocolo modificado de Fontaine et al., 2016; que permite evaluar la infección -a través de la carga viral en excretas- de mosquitos alimentados con el virus del dengue sin necesidad de sacrificarlos.

Después de la alimentación -con el estado activo de cada uno de los serotipos del virus del dengue-, se procedió a realizar 5 pooles de 10 mosquitos cada uno de los grupos mencionados con anterioridad. Los mosquitos fueron colocados en un pequeño recipiente de plástico que sostiene en su parte superior una pequeña torunda de algodón empapada con una solución de sacarosa teñida con colorante vegetal; mientras que en la base de este mismo recipiente se encuentra una membrana de papel filtro que funcionó como colector de excretas. La identificación de las excretas es posible gracias al colorante vegetal que contiene la solución azucarada con la cual se alimentaron los mosquitos. Posteriormente, cada una de estas excretas -50 excretas por pool de mosquitos- se colectó y colocó en un microtubo de 1.5 ml. que contiene 200 μ l. de PBS estéril 1X + 100 μ l. de buffer de lisis viral (Qiagen). Las muestras se dejaron incubando por 20 minutos a 56°C y se agitaron en un vortex durante 60 segundos, enseguida se centrifugaron a 8,000 rpm y se recuperaron los sobrenadantes en microtubos de 1.5 ml. para realizar las extracciones del RNA viral a través del método de tiocianato de guanidinio/fenol/cloroformo.

6.7. Extracción de RNA viral en excretas de mosquitos

A cada uno de los sobrenadantes -que se obtuvieron después de centrifugar con el buffer de lisis viral- les fueron adicionados 500 μ l. de Trizol y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos, enseguida se les adicionaron 200 μ l. de cloroformo para obtener la fase acuosa/orgánica y se centrifugaron a 12,500 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa de cada sobrenadante se traspasó a un nuevo microtubo de 1.5 ml. y se le agregó 500 μ l. de isopropanol frío; esta solución se mezcló 10 veces por inmersión y se dejó incubado durante 10 minutos a

temperatura ambiente. Después de la incubación, se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm -durante 15 minutos a 4°C- para acelerar la precipitación del RNA. Tras concluir el tiempo de centrifugación, el contenido de cada microtubo se decantó y enseguida se agregaron 500 µl. de etanol frío al 75%. El contenido de cada microtubo se mezcló durante 30 segundos y se centrifugó una vez más a 11,000 rpm durante 10 minutos. El etanol fue decantado de cada uno de los tubos y estos fueron colocados en un termoblock a 56°C durante 3 minutos para eliminar por completo cualquier residuo del alcohol. Finalmente, a cada uno de estos microtubos de 1.5 ml. -completamente secos- se les añadió 21 µl. de solución inyectable o agua libre de nucleasas, y fueron almacenados hasta su uso a una temperatura de -20°C.

* Este mismo protocolo fue empleado para extraer RNA total de mosquitos enteros.

6.8. Cuantificación de RNA viral

La concentración, así como la relación 260/280 nm del RNA total y de las excretas de mosquitos se determinó en un NanoPhotometer NP80 (Implen) usando 1 µl. de la extracción del RNA.

6.9. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de cDNA, se emplearon 500 ng/µl de RNA viral de excretas de mosquito -como templado en una reacción de 20 µl.- usando el kit Revert Aid Premium Transcriptasa Reversa (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. Previamente, cada una de las muestras recibió un tratamiento con DNasa durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo, se agregó a cada una de estas 1 µl. de DNA stop solution y posteriormente se dejaron incubando a 65°C durante 10 minutos. Enseguida se preparó una mezcla que contenía hexámeros, dNTPs y agua libre de nucleasas; por muestra se agregaron 6 µl. de este mix y se dejaron incubando durante 5 minutos a 65°C. Una nueva mezcla se preparó usando buffer RT [5X], RNA inhibitor y Revert aid; de este nuevo mix se colocaron por muestra 6 µl. y las muestras se dejaron en un termociclador T100 de BioRad con el siguiente programa de incubación: 25°C durante 10 minutos, 50°C durante 30

minutos y 85°C durante 15 minutos. Tras finalizar la incubación, cada una de las muestras fue almacenada a -20°C hasta su uso posterior.

6.10. Detección de RNA viral mediante qPCR

Un microlitro del producto de la reacción de cDNA [500 ng/μl] fue usado como templado para la amplificación del RNA viral -empleando el kit comercial QuantiNova Multiplex RT-PCR (QIAGEN)-.

El contenido para cada reacción de qPCR, así como las condiciones programables del termociclador se muestran a continuación:

REACTIVOS	1X
Master mix (Quantinova)	2.5 μl
Primers Foward/Reverse DENV	.8 μl
Primers Foward/Reverse RNasaP	.8 μl
Sonda DENV	.25 μl
Sonda RNasaP	.25 μl
Agua libre de nucleasas	4.4 μl
cDNA [500 ng/μl]	1 μl
Volumen final	10 μl

PROGRAMA DE TERMOCICLADO			
Ciclo	Paso	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización inicial	2:00 m	95°C
40	Desnaturalización	0:15 s	95°C
	Alineamiento/Extensión	0:45 s	60°C

6.11. Secuenciación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue

Tres microlitros del producto de la reacción de cDNA que corresponde al sobrenadante de células C6/36 infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue fueron usados como templado para la amplificación del RNA viral, empleando DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El contenido para cada reacción de PCR en punto final, así como las condiciones programables del termociclador y las características de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de cada uno de los serotipos se muestran a continuación:

REACTIVOS	1X
DreamTaq DNA polimerasa	.25 µl
Buffer DreamTaq	4.0 µl
dNTP's	2.0 µl
Primers Foward/Reverse DENV all	1.0 µl
Agua libre de nucleasas	9.75 µl
cDNA [500 ng/µl]	3.0 µl
Volumen final	20 µl

PROGRAMA DE TERMOCICLADO		
Temperatura	Tiempo	Ciclo
94°C	2 minutos	1
94°C	20 segundos	40
57°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	1

Oligonucleótido	# Ntds	Tm
Foward: 5'-CAA TAT GCT GAA ACG CGA GAG AA-3 '	23	65.11
Reverse: 5'-CCC CAT CTA TTC AGA ATC CCT GC-3 '	23	68.06

El producto de amplificación (10 µl) de cada reacción de PCR en tiempo real fue cargado en un gel de agarosa al 2%, y visualizado posteriormente bajo luz ultravioleta para obtener y purificar las bandas correspondientes con el tamaño de amplicon deseado para el virus del dengue -que es de aproximadamente 200 pb-.

7.- RESULTADOS

7.1. Secuenciación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue

Para garantizar que cada una de las infecciones de mosquitos *Aedes aegypti* se estuviera realizando con el serotipo correcto, se procedió a la identificación de cada uno de estos a través de una secuenciación.

El producto de amplificación de la PCR en punto final de cada uno de los serotipos a evaluar fue cargado en un gel de agarosa al 2% y visualizado posteriormente en un fotoiluminador bajo luz UV para identificar las bandas que corresponden con el tamaño del amplicón esperado -200 pares de bases- para el virus del dengue (Figura 6). Una vez identificadas las bandas de cada una de las muestras, estas fueron cortadas del gel de agarosa con un escalpelo estéril y almacenadas en microtubos de 1.5 ml., donde posteriormente se llevó a cabo la purificación del material genético viral usando el kit de extracción de la marca comercial QIAGEN. Una vez purificadas, las muestras fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (Ibt) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y fueron finalmente analizadas mediante herramientas bioinformáticas para asegurarse de que correspondieran a los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.

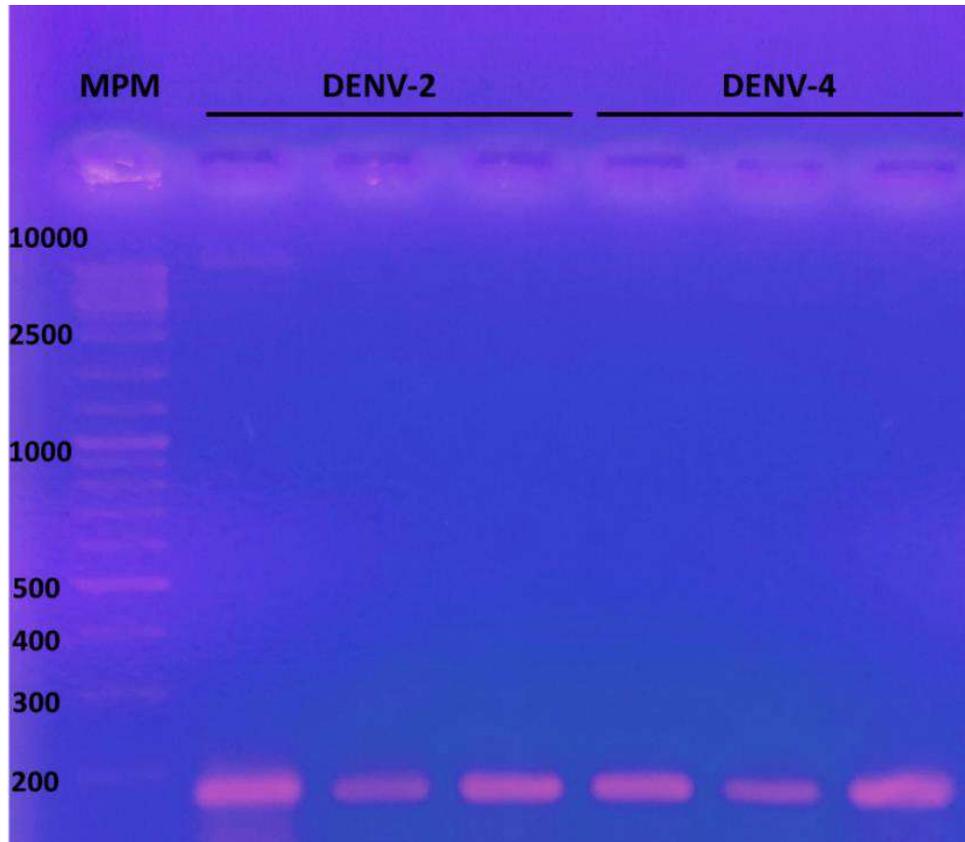


Figura 6. Productos de amplificación del virus del dengue -serotipos 2 y 4- a través de PCR en punto final. La imagen muestra un gel de agarosa al 2% y los productos de amplificación de una reacción de PCR en punto final de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue. Los primeros tres pozos delante del marcador de peso molecular corresponden al serotipo 2, mientras que el resto de los pozos corresponden a la reacción de amplificación del serotipo 4. Se puede observar claramente que el peso molecular de cada una de las bandas corresponde con el tamaño esperado del amplicón que es de 200 pares de bases.

La lectura de cada uno de los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación fueron visualizados con la herramienta bioinformática GENTle (<http://gentle.magnusmanske.de/>). Las bases nucleotídicas que no se resolvieron automáticamente con el programa fueron corregidas manualmente eligiendo el pico más alto de la lectura para cada una de esas posiciones.

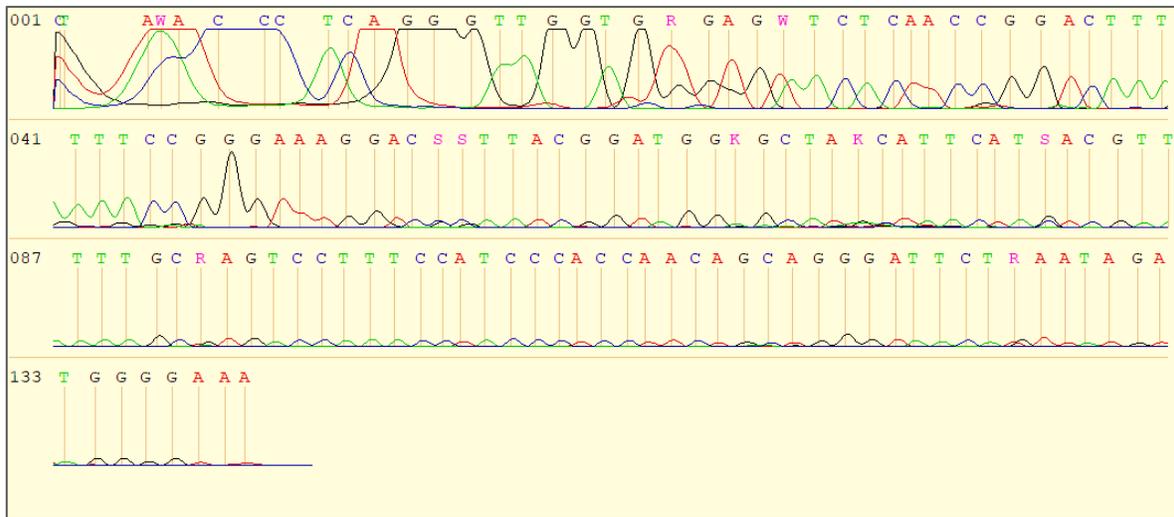
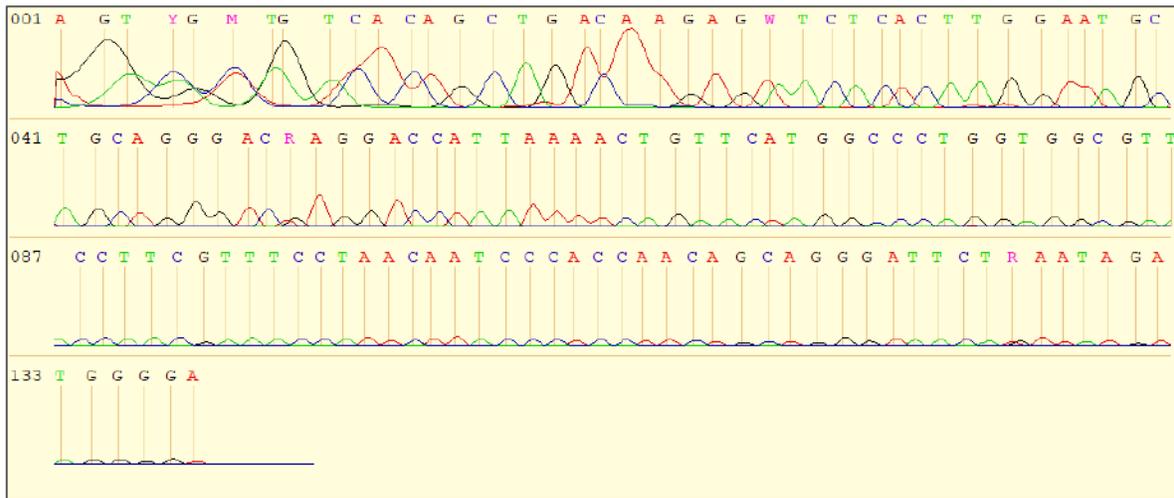


Figura 7. Electroferogramas representativos, obtenidos de la secuenciación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue. La imagen muestra la lectura de los electroferogramas obtenidos a partir de la secuenciación de los productos de amplificación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.

Con las secuencias depuradas, se realizó un alineamiento local comparando cada una de las secuencias con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta bioinformática BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (disponible en línea: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Las secuencias obtenidas de cada uno de los serotipos presentaron un porcentaje de similitud del 90% con respecto a varias secuencias enlistadas en la base de datos del NCBI (Figura 8).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate human polyprotein (POLY) gene, partial cds	Dengue virus 2	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate C6L_P56, complete genome	Dengue virus 2	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate C6L_P30, complete genome	Dengue virus 2	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate C6L_48h, complete genome	Dengue virus 2	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 2 isolate ngc-2007, complete genome	Dengue virus 2	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Chimeric Dengue virus vector p4(Delta30)-D2-CME, complete sequence	Chimeric Dengue virus vector p...	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Chimeric Dengue virus vector p4-D2-CME, complete sequence	Chimeric Dengue virus vector p...	219	219	99%	5e-53	95.07%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus isolate Ser2_Thailand_Bangkok_Sao82 polyprotein gene, complete cds	Dengue virus	219	219	99%	5e-53	95.07%

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 isolate h241-2007, complete genome	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus isolate DENVEN-CC0030, complete genome	Dengue virus	193	193	92%	3e-45	90.98%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 isolate 00151-P, complete genome	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 isolate D4_34_1992 polyprotein precursor, nonstructural protein NS2A, nonstructural protein NS4B...	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 strain H241 polyprotein gene, complete cds	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 isolate DENV-4/KBPV-VR-31, complete genome	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 strain MG-41/2013 polyprotein gene, partial cds	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%
<input checked="" type="checkbox"/>	Dengue virus 4 isolate DENV4/PUERTORICO/1998/347751 polyprotein (POLY) gene, complete cds	Dengue virus 4	193	193	95%	3e-45	90.44%

Figura 8. Porcentaje de cobertura de los productos de amplificación de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue con genomas enlistados en la base de datos del NCBI.

7.2. Infección de células C6/36 con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue

Para obtener la mayor concentración viral de cada uno de los serotipos empleados en esta investigación se determinó el punto máximo de infección realizando una cinética de infección en células C6/36. Estas células en estado confluyente fueron incubadas respectivamente con 500 μ l. de los serotipos 2 y 4 del virus del dengue durante 3 horas y posteriormente fueron almacenadas en una incubadora a 28°C durante 5 días. En el transcurso de esos días fueron tomados cuidadosamente de cada una de las cajas infectadas 500 μ l. de sobrenadante celular, y estos fueron almacenados en microtubos de 1.5 ml. Posteriormente, el contenido de cada uno de los tubos fue procesado para la extracción del material genético viral. Las muestras fueron cuantificadas y normalizadas -a 500 ng/ μ l- para usar como templado en la síntesis de cDNA. El producto de la reacción de cDNA fue empleado para la amplificación viral mediante RT-qPCR. El procedimiento anterior se llevó a cabo de la misma forma en células C6/36 que fueron incubadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue previamente irradiados con luz UV durante 3 horas. El objetivo de realizar esta infección con virus irradiados fue para observar el comportamiento de la infección por el virus del dengue -previamente irradiado con luz UV- en células C6/36 y para determinar si la exposición a la luz UV inactiva de manera completa la replicación de las partículas virales.

Los resultados de la figura 9 muestran una disminución en el número de copias de RNA viral por mililitro en los sobrenadantes de células C6/36 infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue que fueron previamente irradiados con luz UV en comparación con los sobrenadantes de células C6/36 que fueron infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue sin exposición a la luz UV. Esta diferencia en la carga viral entre ambos grupos evaluados se mantuvo a lo largo de la cinética establecida que comprendió los puntos de las 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h post-infección.

Por otro lado, también se puede observar un comportamiento similar en la dinámica de infección de ambos serotipos -en células C6/36- que no fueron expuestos a luz UV durante todo el periodo de tiempo en que transcurrió la cinética.

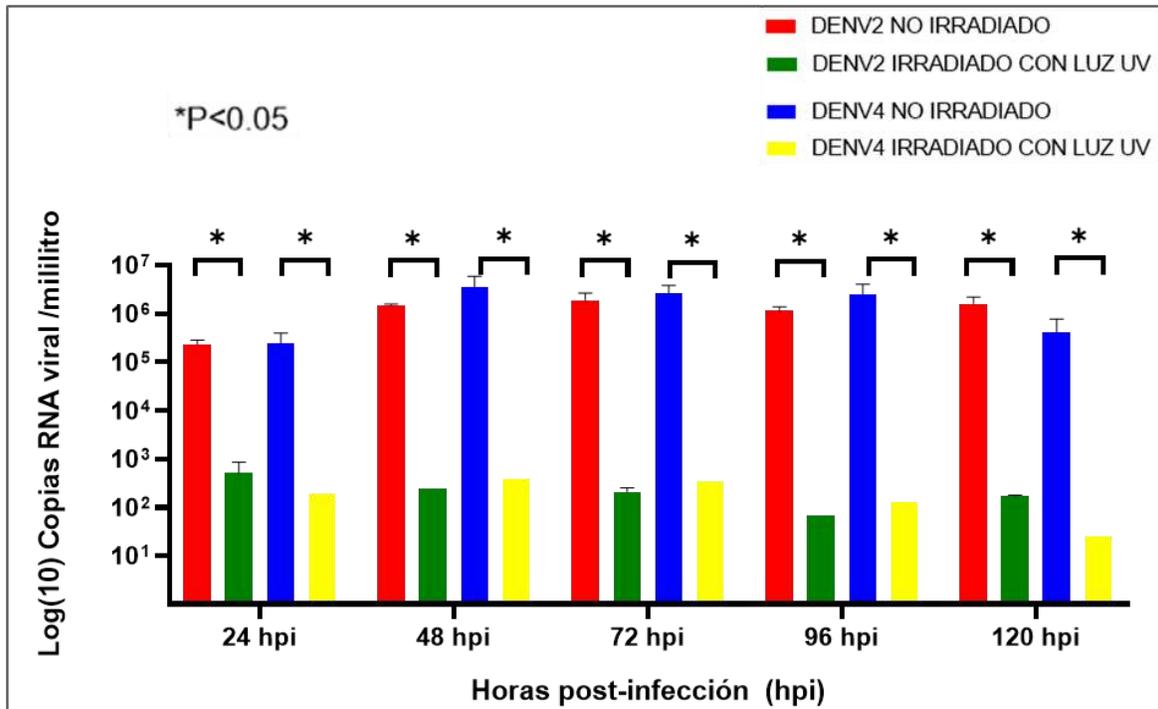


Figura 9. Cinética de infección de células C6/36 con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue. La gráfica muestra en el eje de la Y el número de copias de RNA viral/ml. detectado en el sobrenadante de células C6/36 infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue, mientras que el eje de la X muestra los puntos de tiempo en que fueron colectados cada uno de los sobrenadantes de estas células infectadas. Las primeras dos barras en cada punto de tiempo corresponden a la infección con el virus del dengue serotipo 2 en estado activo (color rojo) y en estado expuesto a luz UV durante 3 horas (color verde). La tercer barra en cada punto de tiempo (color azul) corresponde a la infección realizada en células C6/36 infectadas con el virus del dengue serotipo 4 en estado activo, mientras que la barra en color amarillo representa el sobrenadante de células C6/36 expuestas a DENV-4 que fue irradiado previamente con luz UV. Los datos de la infección en células C6/36 fueron analizados aplicando una Anova de 2 vías de comparación múltiple de Tukey. La prueba estadística fue sujeta a un valor de $p < 0.05\%$ para una diferencia significativa. Los datos fueron analizados y graficados en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

7.3. Cuantificación relativa de la proteína no estructural NS1

Para validar nuestro método de inactivación de partículas virales por exposición previa a luz UV se procedió a cuantificar de forma relativa a la proteína no estructural NS1 del virus del dengue. La proteína NS1 (46-50 kDa) es una glicoproteína del DENV de secuencia altamente conservada en los cuatro serotipos, que se puede detectar durante la fase febril de la enfermedad debido a que es la única de todas las proteínas no estructurales que se secretan al medio extracelular durante el proceso de replicación viral en la célula hospedera (Dewi et al., 2009; Muller y Young, 2013).

La cuantificación de la proteína NS1 se realizó de acuerdo con el fabricante empleando el kit comercial Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad), usando como sustrato el sobrenadante de células C6/36 que fueron infectadas previamente con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue -expuestos y no expuestos a luz UV. La presencia del antígeno NS1 en cada una de las muestras evaluadas se estableció comparando la densidad óptica que se obtuvo en el espectrofotómetro (450/620 nm) con respecto a la muestra del calibrador. Una relación por arriba de 1 es considerada positiva a NS1, mientras que por debajo de 1 es considerada negativa.

De las muestras evaluadas, se observó una relación negativa -en cada uno de los puntos de tiempo- en aquellos sobrenadantes de células C6/36 que fueron infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue -expuestos previamente a luz UV-. Sin embargo, una relación positiva fue observada a lo largo de la cinética en los sobrenadantes de células C6/36 que fueron infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue sin exposición previa a la luz UV. Estos resultados confirman que la irradiación con luz UV limitó la replicación viral en los serotipos 2 y 4 del virus del dengue al no poder detectar a la proteína no estructural 1 (Figura 10).

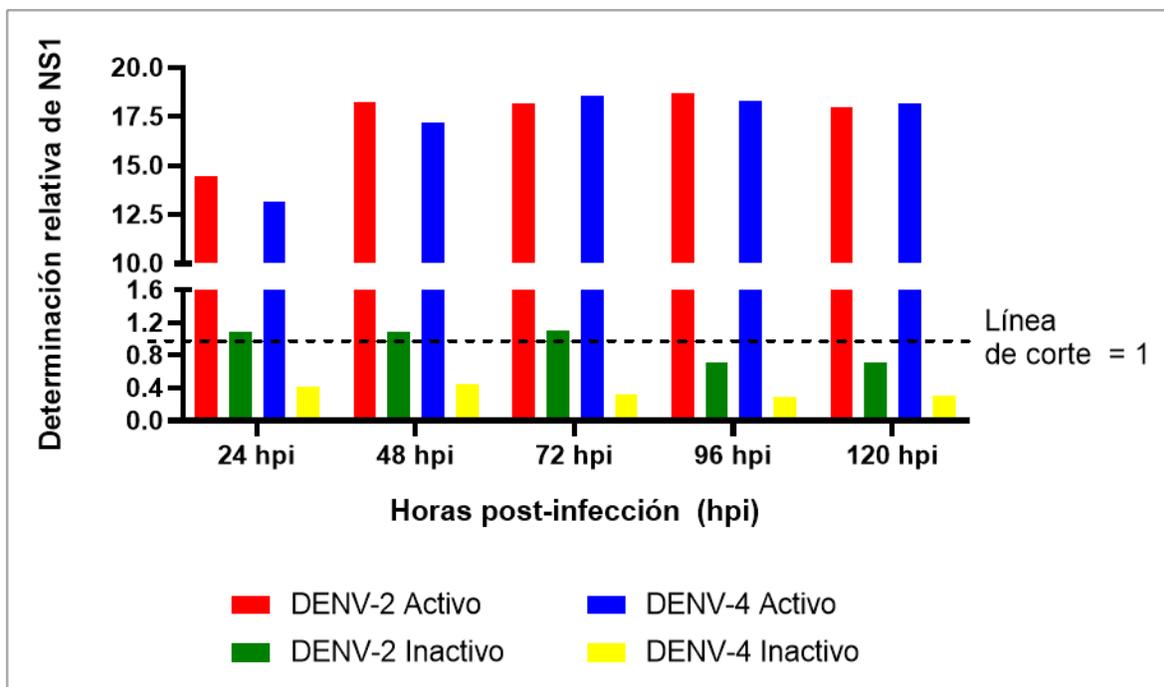


Figura 10. Cuantificación relativa de la proteína no estructural NS1. El gráfico muestra en el eje de la Y la densidad óptica obtenida en el espectrofotómetro del sobrenadante de células C6/36 infectadas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue expuestos y no expuestos a luz UV, mientras que el eje de la X muestra los puntos de tiempo en que fueron colectados cada uno de los sobrenadantes de estas células infectadas. Las primeras dos barras en cada punto de tiempo corresponden a la infección con el virus del dengue serotipo 2 en estado activo (color rojo) y en estado expuesto a luz UV durante 3horas (color verde). La tercer barra en cada punto de tiempo (color azul) corresponde a la infección realizada en células C6/36 infectadas con el virus del dengue serotipo 4 en estado activo, mientras que la barra en color amarillo representa el sobrenadante de células C6/36 expuestas a DENV-4 que fue irradiado previamente con luz UV. También se observa la línea de corte para esta cuantificación donde una relación por arriba de 1 es considerada positiva, mientras que por debajo de 1 es considerada negativa. Los datos de la cuantificación relativa de la proteína NS1 fueron graficados en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

7.4. Confirmación de la infección por DENV en mosquitos *Aedes aegypti*

La infección en varios pools de mosquitos adultos -*Aedes aegypti*- fue evaluada mediante RT-qPCR. Esto con el objetivo de confirmar la infección por el virus del dengue en cada uno de los grupos que fueron empleados para realizar las infecciones homologas y heterólogas. Un pool de 5 mosquitos *Aedes aegypti* de cada uno de los grupos evaluados fue tomado a los 7, 14 y 21 días después de haber realizado la infección con cada uno de los serotipos en estado activo, y fueron colocados en 500 µl. de Trizol para llevar a cabo la extracción del RNA viral. Las muestras fueron cuantificadas y normalizadas para usar 500 ng/µl como sustrato para la síntesis de cDNA. Finalmente, 1µl. del producto de la reacción de cDNA fue empleado para amplificar y detectar por RT-qPCR la infección por el virus del dengue en mosquitos *Aedes aegypti*.

Los resultados que se muestran en la figura 11 corresponden a las infecciones de mosquitos *Aedes aegypti* con DENV-2. En todos los grupos evaluados se confirmó la infección por DENV a los 7, 14 y 21 días, siendo el punto de los 21 días donde se observa una diferencia en la carga viral de los grupos de mosquitos que recibieron una inmunización previa con respecto al grupo control. Esto se observó tanto para el grupo de mosquitos que recibieron un reto de forma homóloga como de aquellos mosquitos que recibieron un reto de forma heteróloga.

En el caso de mosquitos *Aedes aegypti* infectados con DENV-4 (Figura 12) también se pudo confirmar mediante RT-qPCR el establecimiento de la infección a los 7, 14 y 21 días. A diferencia de los mosquitos infectados con DENV-2, aquí se pudo observar una disminución en la carga viral desde los 14 días post-infección en los grupos previamente retados con respecto al grupo control.

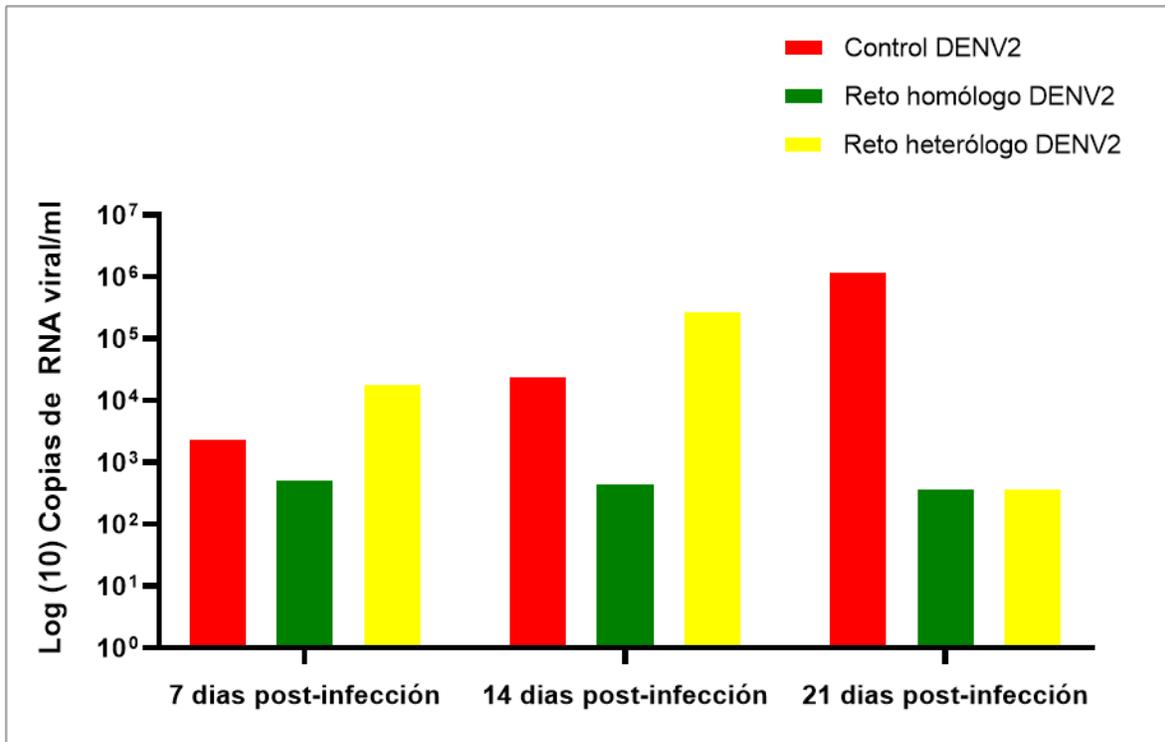


Figura 11. Infección de mosquitos *Aedes aegypti* después de la alimentación con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue en estado activo. La gráfica muestra en el eje de la Y el número de copias de RNA viral que fue detectado mediante RT-qPCR en pools de cinco mosquitos que recibieron 7 días antes una inmunización previa con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue, mientras que el eje X muestra cada uno de los grupos de los cuales fueron tomados los mosquitos para hacer la detección del RNA viral. Abreviaturas: **CTRL DENV-2**: Mosquitos alimentados con DENV-2 activo que no recibieron previamente una inducción o priming (Barra roja). **DENV2 HM**: Mosquitos que recibieron un reto homólogo con dengue 2 (Barra verde). **DENV2 HT**: Mosquitos que recibieron un reto heterólogo con dengue 4 (Barra amarilla). Los datos de la carga viral en mosquitos *Aedes aegypti* fueron graficados en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

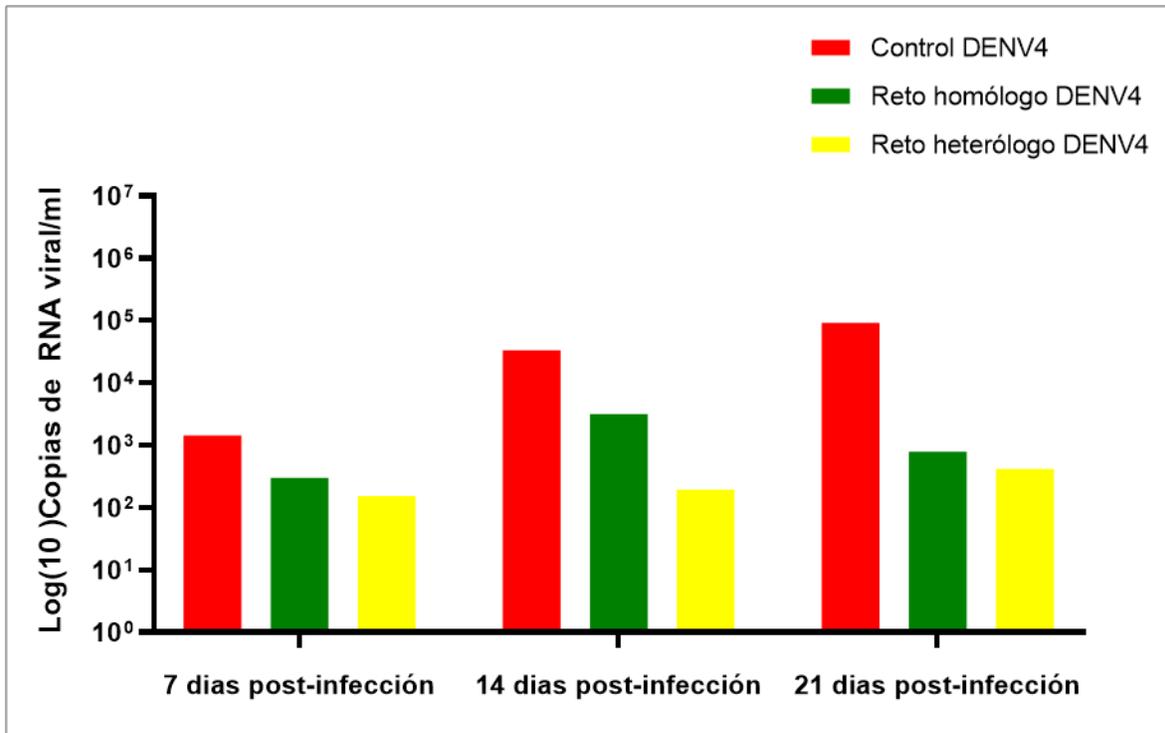


Figura 12. Infección de mosquitos *Aedes aegypti* después de la alimentación con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue en estado activo. La gráfica muestra en el eje de la Y el número de copias de RNA viral que fue detectado mediante RT-qPCR en pools de cinco mosquitos que recibieron 7 días antes una inmunización previa con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue, mientras que el eje X muestra cada uno de los grupos de los cuales fueron tomados los mosquitos para hacer la detección del RNA viral. Abreviaturas: **CTRL DENV-4**: Mosquitos alimentados con DENV-4 activo que no recibieron previamente una inducción o priming (Barra roja). **DENV4 HM**: Mosquitos que recibieron un reto homólogo con dengue 4 (Barra verde). **DENV4 HT**: Mosquitos que recibieron un reto heterólogo con dengue 2 (Barra amarilla). Los datos de la carga viral en mosquitos *Aedes aegypti* fueron graficados en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

7.5. Cinética de infección por DENV en excretas de mosquitos *Aedes aegypti*

Para evaluar la especificidad del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* se realizaron infecciones homólogas y heterólogas -con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue-. Los mosquitos inicialmente fueron separados en seis grupos -con 100 individuos cada uno- y se alimentaron de forma artificial durante 30 minutos a través de un alimentador de vidrio -que tiene acoplada una membrana de papel parafilm-. Tras concluir el tiempo de alimentación, se realizó un tamizaje en cada uno de los grupos para separar a los mosquitos que no se alimentaron. Los mosquitos que si se alimentaron con la sangre que contenía partículas virales -inactivadas por luz UV- se colocaron nuevamente en el insectario durante una semana hasta realizar la siguiente alimentación.

Los resultados que se observan en la gráfica de la figura 13 muestran una tendencia significativa en la disminución del número de copias de RNA viral en excretas de mosquitos *Aedes aegypti* en el transcurso de la infección a los 7 y 14 días después de realizar el segundo reto con cada uno de los serotipos en los diferentes grupos experimentales.

La inducción realizada con el serotipo 4 del virus del dengue en mosquitos *Aedes aegypti* desencadenó una respuesta inmune mejorada en el grupo homólogo con respecto al grupo heterólogo que corresponde a mosquitos que se les indujo priming con DENV-4. Por otro lado, la inducción de priming inmunológico en mosquitos *Aedes aegypti* con el virus del dengue -serotipo 2- parece no ser suficiente para generar un estado protector en el grupo de mosquitos que recibió una inducción previa con DENV-2 -irradiado con luz UV- y un reto activo posteriormente con el virus del dengue -serotipo 4-.

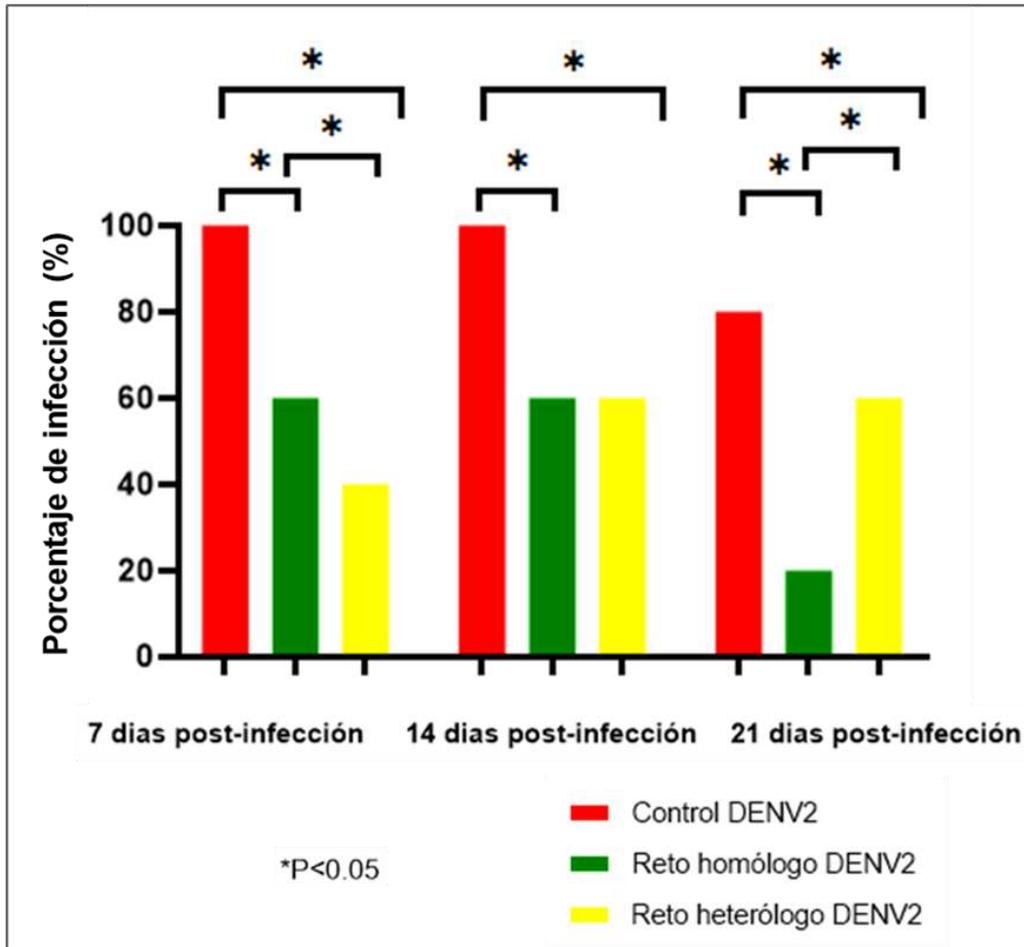


Figura 13. Prevalencia de la infección en excretas de mosquitos *Aedes aegypti* que recibieron una inducción o priming inmunológico con el serotipo 2 del virus del dengue de forma homóloga y heteróloga. La gráfica muestra en el eje de la Y el número de copias de RNA viral que fue detectado mediante RT-qPCR por pools de excretas de 50 mosquitos, mientras que el eje X muestra cada una de las combinaciones a las que fueron sometidos cada uno de los grupos experimentales a evaluar. P.ej. Grupo Priming Heterólogo con DENV2, corresponde a mosquitos que se les indujo priming con DENV-2 y una semana después fueron expuestos con DENV-4. La grafica también muestra la carga viral en cada uno de los grupos a los 7, 14 y 21 días después de haber sido retados con cada uno de los serotipos del virus del dengue. Las pruebas estadísticas que se aplicaron fueron sujetas a un valor de $p < 0.05\%$ para una diferencia significativa. Los datos fueron analizados y graficados en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

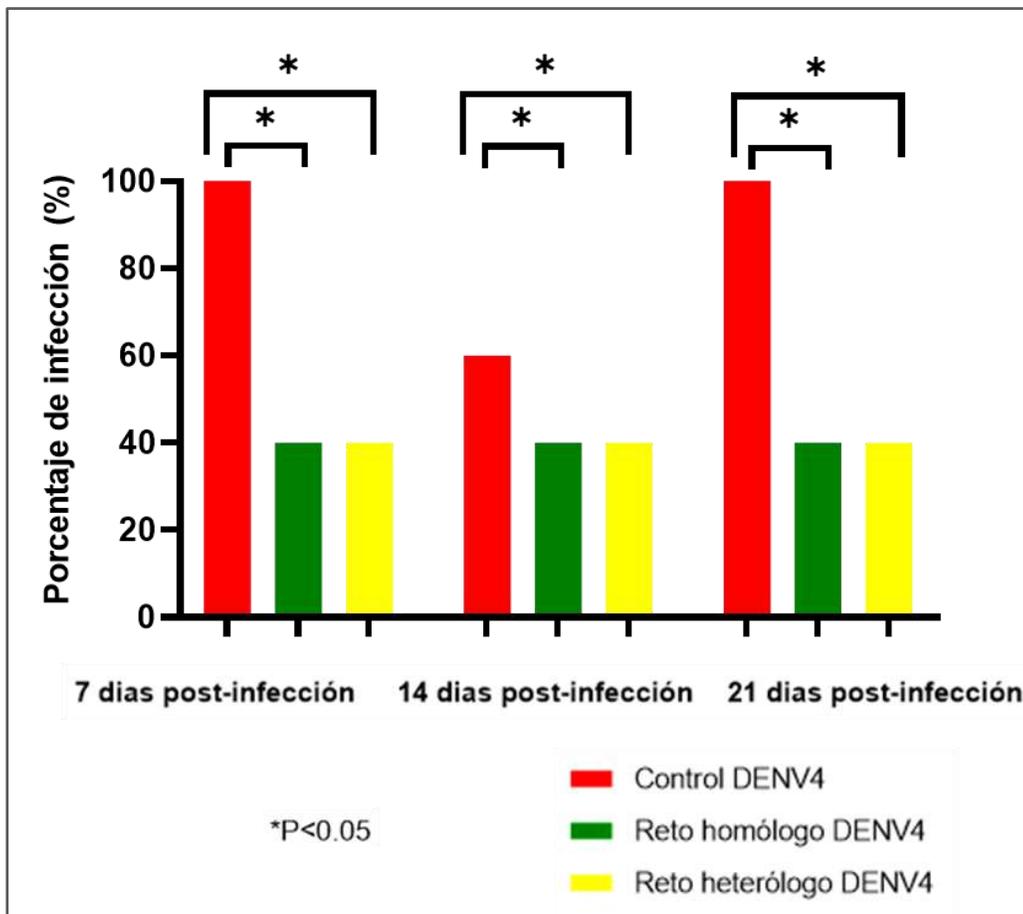


Figura 14. Prevalencia de la infección en excretas de mosquitos *Aedes aegypti* que recibieron una inducción o priming inmunológico con el serotipo 4 del virus del dengue de forma homóloga y heteróloga. La gráfica muestra en el eje de la Y el número de copias de RNA viral que fue detectado mediante RT-qPCR por pooles de excretas de 50 mosquitos, mientras que el eje X muestra cada una de las combinaciones a las que fueron sometidos cada uno de los grupos experimentales a evaluar. P.ej. Grupo Priming Heterólogo con DENV4, corresponde a mosquitos que se les indujo priming con DENV-4 y una semana después fueron expuestos con DENV-2. La grafica también muestra la carga viral en cada uno de los grupos a los 7, 14 y 21 días después de haber sido retados con cada uno de los serotipos del virus del dengue. Las pruebas estadísticas que se aplicaron fueron sujetas a un valor de $p < 0.05\%$ para una diferencia significativa. Los datos fueron analizados y graficados en el programa GraphPad Prism versión 6.1.

8.- DISCUSIÓN

La especificidad se define como la capacidad que tiene el sistema inmune para poder discriminar entre dos o más agentes patógenos (Milutinovic y Kurtz, 2016). En los mamíferos, se ha evidenciado que la respuesta inmune adaptativa genera respuestas muy específicas para cada agente infeccioso y que además mediante mecanismos muy sofisticados se generan recuerdos de él (memoria) para impedir la reinfección.

En los insectos, y particularmente en el mosquito vector *Aedes aegypti* se ha observado algo similar con respecto a la manera en la cual este organismo se defiende ante una infección por el virus del dengue. Sin embargo, el debate se ha generado debido a que se cree poco probable que los insectos tengan la misma capacidad de los mamíferos de recordar un agente patógeno en una infección secundaria.

Este fenómeno particular -en los insectos- se ha denominado priming inmunológico y guarda cierta similitud con algunos eventos de la respuesta adaptativa de los vertebrados como son: la especificidad, la protección de larga duración y el incremento de la actividad de los mecanismos de defensa tras un encuentro previo con un agente patógeno (Cooper y Eleftherianos, 2017; Medina-Gómez, et al., 2018). En el caso de la especificidad, es necesario aún responder algunos vacíos relevantes como es el proceso de discriminación de serotipos. En el mosquito *Aedes aegypti* se desconoce si existe una discriminación entre los distintos serotipos del virus del dengue y si las respuestas que se generan son específicas para cada uno de ellos.

Una manera en la cual el mosquito podría discriminar entre uno y otro serotipo sería mediante la interacción de los determinantes antigénicos de cada serotipo con receptores específicos ubicados en la superficie de las células que el virus infecta. Esto podría traducirse en respuestas inmunológicas totalmente diferenciadas. Sin embargo, se conoce que el virus del dengue no usa un receptor único y específico para entrar a la célula huésped; sino que reconoce y se une a un

panel extenso de moléculas. En infecciones de líneas celulares, particularmente de la línea C6/36 se ha observado que los serotipos 2 y 4 del virus del dengue emplean receptores totalmente diferentes para su entrada (Reyes-del Valle & del Angel, 2014), mientras que en infecciones de mosquitos *Aedes aegypti* la enolasa y una proteína de 80 KDa actúan como receptores para la entrada de los cuatro serotipos del virus del dengue.

La ausencia de un reconocimiento específico durante la infección del mosquito *Aedes aegypti* con cualquiera de los serotipos del virus del dengue podría traducirse en beneficios para su sobrevivencia. Si las respuestas fueran específicas para cada serotipo -asumiendo que existe un encuentro diferente con alguno de ellos- en una reinfección, la activación de los mecanismos de defensa inmune no serían lo bastante rápidos y efectivos. Esto finalmente no resultaría útil, pues el virus podría replicarse más de lo normal y terminaría dañando al mosquito que le sirve como medio para diseminarse en otros huéspedes. Lo anterior no se relaciona con lo que hasta ahora se ha observado en infecciones de mosquitos *Aedes aegypti*, donde la infección por dengue no parece perjudicar el comportamiento o vida útil del insecto; esto indica que se han desarrollado mecanismos de defensa para tolerar infecciones persistentes y restringir la replicación viral a niveles que no comprometen su integridad (Lambrechts et al., 2009) y en la que ambos se ven beneficiados pues no se genera daño y se lleva a cabo una diseminación a otros huéspedes de manera exitosa.

El priming inmunológico en mosquitos *Aedes aegypti* maximiza las respuestas inmunitarias que se generan durante la infección y con ello, se rebasa el nivel de tolerancia que se ha observado en infecciones persistentes; por lo tanto, se limita la replicación del virus del dengue y a su vez la transmisión. Los mecanismos de defensa que coadyuvan a limitar la replicación del virus se encuentran implícitamente relacionados con el priming inmunológico.

La memoria inmunitaria en los invertebrados, se define como la capacidad del sistema inmune para almacenar y recordar información de un agente patógeno encontrado previamente tras una exposición específica posterior (Milutinovic y Kurtz, 2016; Bouallegui, 2019). Bajo este concepto, la memoria inmune en invertebrados debe ser específica a nivel de especie o cepa (Contreras-Garduño et al., 2016). Son numerosos los trabajos que evidencian la especificidad en varios ordenes de insectos durante el priming inmunológico; incluido el mosquito vector *Aedes aegypti* con infecciones del virus del dengue. No obstante, cabe mencionar que muchos de estos estudios se realizaron evaluando infecciones homólogas, es decir usando el mismo agente patógeno durante la primera y segunda exposición.

En el contexto de una infección por dengue se conoce que la circulación de múltiples serotipos de DENV en el mismo lugar ha causado coinfecciones con diferentes serotipos en pacientes en infecciones posteriores o simultáneas y se ha demostrado que esto se asocia con un mayor riesgo de dengue grave (Thavara, et al., 2006; Dhanoa, et al., 2016). El recuento de plaquetas, una medida de gravedad de la enfermedad, fue mayor en los pacientes coinfectados que en los mono infectados. Esto puede deberse a una "exclusión de superinfección con un virus homólogo", en la que la gravedad de la enfermedad disminuye cuando coexisten infecciones homólogas. Esto aún no se ha demostrado en humanos, pero se ha demostrado en células de mosquito (Burivong, et al., 2004).

La coinfección puede ocurrir durante brotes en países donde múltiples serotipos de DENV co-circulan permitiendo que el mismo mosquito se alimente de más de un individuo infectado por DENV potencialmente adquiriendo y transmitiendo múltiples serotipos de DENV en alimentaciones de sangre posteriores (Gubler, et al., 1985; Loroño-Pino, et al., 1999; Anoop, et al., 2010). Varios países han notificado previamente infecciones por DENV concurrentes con diferentes serotipos en el mismo paciente en diversos porcentajes, del 3 al 43% (Laille, et al., 1999; Bharaj, et al., 2008; Figueiredo, et al., 2011; Colombo, et al., 2013; Vinodkumar, et al., 2013; Tazeen, et al., 2017). La gran diferencia en los porcentajes de coinfección refleja el predominio de diferentes serotipos de DENV en diferentes

países y la capacidad del vector para transmitir coinfecciones de DENV en estos entornos.

En este escenario, resulta prescindible analizar si la especificidad que se observa durante el priming inmunológico se mantiene durante una infección con diferentes serotipos del virus del dengue en el mosquito *Aedes aegypti*. Experimentalmente, en la presente investigación se realizaron infecciones homólogas y heterólogas con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue y una vez realizadas, la memoria inmunitaria se evaluó comparando la carga viral (n. de copias de RNA viral/ml) en pools de excretas de mosquitos infectados. De acuerdo con Little y Kraaijeveld (2004), la memoria inmunitaria debe evaluarse comparando la respuesta inmunitaria, la supervivencia o la carga del parásito después de un desafío homólogo (similar) frente a desafíos heterólogos (diferentes) a nivel de cepa o especie de parásito o patógeno. Un aumento de la respuesta inmune y la supervivencia y una disminución de la carga de parásitos en el desafío homólogo en comparación con los desafíos heterólogos sugiere evidencia de memoria inmune.

De acuerdo con lo obtenido en los resultados, la especificidad en los grupos de mosquitos infectados de manera homóloga y heteróloga fue diferente. Hubo una disminución de la carga viral en ambos grupos; sin embargo, fue más evidente esa disminución en el grupo de mosquitos infectados de manera heteróloga (DENV4+DENV2) con respecto al grupo control (sin infección previa). Esto sugiere una respuesta inmune mejorada en el grupo heterólogo con respecto al grupo homólogo. Además, de que a diferencia del DENV2, la infección con DENV4 parece inducir un mayor efecto protector.

En mosquitos *Aedes aegypti* retados de manera homóloga y heteróloga con dos serotipos del virus del dengue, el priming inmunológico fue inespecífico. De acuerdo con la literatura (Boraschi e Italiani, 2018; Lanz-Mendoza y Contreras-Garduño, 2022), lo observado no fue producto de la memoria, sino de una mejora o entrenamiento inmunológico inducido por partículas virales inactivadas previamente con luz ultravioleta.

En vertebrados (Netea et al., 2011; Netea y van der Meer, 2017; Gourbal et al., 2018) e invertebrados (Yan et al., 2020; Kulkarni et al., 2021), la memoria inmunológica y la mejora inmunológica se han utilizado como sinónimos y se han definido juntos como entrenamiento inmunológico o preparación inmunológica. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que la mejora inmunológica y el entrenamiento inmunológico son, de hecho, sinónimos de una respuesta inespecífica porque el entrenamiento inmunológico se ha definido como una protección inmunológica mejorada sin especificar que debería ser específico (Netea et al., 2011; Netea y van der Meer, 2017). Por otro lado, la memoria inmunitaria innata (en su mayoría conocida como preparación inmunitaria) proporciona una protección duradera y es una resistencia inmunitaria específica. Esta confusión en el uso de términos puede explicar por qué la memoria inmune parece ser específica o no específica (Rowley y Powell, 2007).

Un procedimiento experimental que podría aclarar lo observado en los resultados, además de discernir entre memoria y mejora inmunológica durante una infección heteróloga en el mosquito *Aedes aegypti* sería el de realizar un desafío heterólogo entre dos desafíos homólogos. El resultado no tendría que verse afectado por un desafío intermedio porque durante el proceso de la memoria, se deberían activar diferentes moléculas de reconocimiento y la memoria del sistema inmune debe responder mejor al patógeno del desafío homólogo. Por otra parte, es necesario realizar infecciones heterólogas con organismos más distanciados filogenéticamente; por ejemplo, bacterias o virus de diferentes familias. Esto nos podría ayudar a comprender aún más el nivel o grado de discriminación que hace el mosquito durante el priming inmunológico. Otros parámetros a considerar, como el lapso de tiempo entre el primer y el segundo encuentro, el desarrollo de la infección a lo largo del tiempo, la evaluación de moléculas efectoras y la comprensión de la naturaleza misma de los agentes patógenos con que se realiza el priming inmunológico indiscutiblemente ayudarían a entender un poco más sobre la naturaleza de este fenómeno inmunológico en los mosquitos transmisores del dengue.

La memoria debería ser favorecida en animales de larga vida (Boots et al., 2013; Garnier et al.; 2013); así como en organismos de vida corta expuestos constantemente a patógenos (Liu, 2000; Litte 2005). Tiene sentido que exista un medio por el cual el sistema inmunitario innato dirija sus recursos a la fuente más probable de infección al detectar componentes que se presentan como una amenaza aguda (Kalyan, et al., 2020). Si es algo con lo que se encuentra constantemente o que se ha establecido una relación constantemente con él, no necesita de dosis altas para hacer frente a su naturaleza y esto es para garantizar la supervivencia y minimizar el uso de recursos. Muchos insectos están mejor protegidos contra un patógeno específico en encuentros recurrentes.

El virus del dengue tiene una historia evolutiva relativamente reciente, con cuatro serotipos que surgieron de progenitores selváticos transmitidos entre primates no humanos por mosquitos *Aedes* hace aproximadamente 1000 años y que solo establecieron una transmisión endémica en humanos en los últimos cien años. Los análisis genéticos realizados hasta la fecha muestran que los cuatro serotipos del virus del dengue son filogenéticamente distintos (Kuno et al., 1998); con diferencias que se estiman en un 20-30% en las secuencias de nucleótidos y poliproteínas, lo que sugiere que juegan un papel importante en la virulencia durante la infección *in vivo*, como *in vitro* (Holmes y Burch, 2000; Holmes y Twiddy, 2003; Rico-Hesse, 2003; Ahmad y Poh, 2019).

En vertebrados, el hecho de que cada uno de los serotipos sean antigénicamente diferentes tiene implicaciones para la vacunación y la investigación sobre la dinámica de la inmunidad, así como de la enfermedad y la propia evolución del virus del dengue. En los mosquitos, a pesar de que se sabe muy poco sobre su diversidad genética, se conoce que los diferentes serotipos de DENV exhiben varios grados de infectividad en una misma población (Gubler, et al., 1979; Carrington, et al., 2005; Weaver y Vasilakis, 2009; Novelo, et al., 2019; Ekwudu, et al., 2020).

La aptitud replicativa del dengue es una característica biológica importante para la evolución del virus y contribuye a dilucidar el comportamiento de las poblaciones de virus y la patogénesis viral. La capacidad infecciosa y el efecto

citopático son dependientes de la cepa viral, lo que demuestra que algunas características biológicas de los virus no son compartidas dentro del mismo serotipo. Durante la infección de las células C6/36 y MK2 encontramos diferentes grados de patogenicidad entre los serotipos 2 y 4 del virus del dengue al observar un mayor efecto citopático producido por el serotipo 2. Estas diferencias que están asociadas con la aptitud replicativa de cada serotipo pueden afectar la dinámica de activación de mecanismos de defensa del mosquito vector y por ende, afectar la dinámica de la infección viral, modulando el potencial de transmisión del patógeno (Gutiérrez-Barbosa, et al., 2019). Un estudio evaluó la aptitud replicativa de DENV en células de mosquito C6/36 y colonias de *A. aegypti* usando una cepa viral de cada serotipo de DENV y describió una aptitud diferencial entre serotipos, en la que DENV-2 tenía la capacidad replicativa más alta seguida por DENV-1, DENV-4 y DENV-3 (Quintero-Gil, et al., 2014; Quintero-Gil, et al., 2018).

La glicoproteína E es importante para la unión del receptor celular y la subsiguiente infección de la membrana de la célula diana (Mukhopadhyay, et al., 2005). También el gen que codifica para esta proteína ha sido identificado como un determinante clave de la virulencia (Sánchez y Ruiz, 1996). En un estudio experimental, se observó que las secuencias de nucleótidos de once clones de una cepa mexicana de DENV2 que producía grandes placas líticas presentaban mutaciones en el nucleótido 1168 (G-->C) genera una diferencia de aminoácido en el residuo 390 (Asp-->His) de la proteína de envoltura. Estos clones mostraron una alta virulencia en ratones lactantes cuando se inocularon intracerebralmente (>70% de mortalidad). Sin embargo, los clones que mostraron pequeñas placas líticas mostraron una sustitución de Asp-->Asn en la misma posición y tenían una virulencia atenuada. Con base en estos datos, se llegó a la conclusión de que el residuo 390 quizás afecta un elemento estructural funcionalmente importante que podría ser un determinante de la virulencia del dengue. Esta sustitución cae en el dominio III de la proteína E, que juega un papel importante en la unión viral; por lo tanto, la sustitución afecta la virulencia y el tropismo celular en el mosquito.

Es probable que los serotipos de DENV hayan evolucionado para utilizar diferentes componentes de la maquinaria celular en el proceso de replicación viral y por ende, pueden tener un fitness replicativo diferencial, que podría estar relacionado con la expresión de receptores, así como con la localización celular de proteínas virales (Domingo y Holland, 1997; Tsang, et al., 2019).

Debido a estas diferencias, es posible que en el mosquito algunos serotipos no induzcan una respuesta inmune exacerbada y, por lo tanto, mantengan una interacción con la célula huésped que favorece la producción de progenie viral y conduce a una replicación viral, además de la activación de los mecanismos de defensa del insecto, esto en comparación con serotipos más virulentos (Gutiérrez-Barbosa, et al., 2020). La inducción del priming inmunológico con partículas virales previamente inactivadas con luz ultravioleta, podrían estar activando estos mecanismos de defensa a un nivel en el que no se comprometen los recursos energéticos para hacer frente posteriormente a una infección con el agente patógeno en su forma activa.

En ausencia de un modelo convencional, existe una amplia variabilidad en la forma en que se puede inducir priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* y otros insectos. Factores como la especie de invertebrado, etapa de desarrollo e inmunógeno utilizado deben tomarse en cuenta durante la planificación de experimentos para evaluar este fenómeno inmunológico. Las especies analizadas se pueden seleccionar por su facilidad de reproducción y manejo, como es el caso del mosquito *Aedes*, o por otras características, como un genoma completamente secuenciado, como en el caso de *Tenebrio molitor* o *Bombix morii* (Oppert, et al., 2012; Yi, et al., 2019). La etapa de desarrollo es importante debido a las diferencias en la fisiología, el metabolismo y la inmunidad entre las etapas. La elección de la etapa de desarrollo específica para el priming puede estar influenciada por los microorganismos circundantes y las capacidades de crianza y manejo de los invertebrados (Tetreau, et al., 2019; Vargas, et al., 2020). El inmunógeno utilizado también determina la especificidad y la duración de la respuesta (Cooper y Eleftherianos, 2017).

Muchos estudios han utilizado una baja concentración de microorganismos vivos como inmunógeno, inoculando una dosis no letal para provocar la respuesta inicial adecuada (Vargas, et al., 2016; Jacobs, et al., 2017; Vertyporokh, et al., 2019). Sin embargo, otros estudios han descrito la inoculación de microorganismos vivos a concentraciones más altas que reproducen la infección natural (Manfredini, et al., 2010; Contreras-Garduño, et al., 2015) sin mortalidad de invertebrados (Moreno-García, et al., 2015). Nuestro estudio no tomo a consideración el efecto de la dosis para realizar la inducción del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti*, es importante considerar este factor en próximos experimentos. Sin embargo, lo que si se tomó en cuenta fue el título infeccioso para realizar las infecciones homologas y heterólogas. Es importante recordar que durante los experimentos de infección de células de mamífero e insecto se observaron diferencias en el fitness de replicación viral. Estas diferencias significativas siempre mostraban una mayor replicación viral en el serotipo 2, con respecto al serotipo 4. Esto podría representar un problema, ya que el efecto observado durante el fenómeno evaluado podría deberse a una diferencia entre las cargas virales con que se realiza la inducción y no al priming inmune. Después de múltiples pases en cada una de las células, los títulos infecciosos lograron equipararse para iniciar la inducción del priming inmunológico.

El priming con microorganismos inactivados puede inocular una alta concentración del inmunógeno, evitando el riesgo de mortalidad. Este método podría ser ventajoso, porque la inmunización depende de la dosis (Wu, et al., 2016). Sin embargo, la técnica utilizada para la inactivación (generalmente formalina o calor) puede interferir con el priming (Lin, et al., 2013). Los compuestos derivados de microorganismos, como el peptidoglicano o el lipopolisacárido, también se utilizan como inmunógenos (Moret y Schmid-Hempel, 2000; Wu, et al., 2015). La inducción del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* se realizó con partículas virales inactivadas por luz ultravioleta durante 3 horas. El éxito de la inactivación se evaluó en una cinética analizando la carga viral en el sobrenadante de células C6/36 expuestas previamente con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue irradiados con luz ultravioleta por tres horas. Durante el transcurso de la infección,

se obtuvo sobrenadante de cada una de las células y se analizó la carga viral (N. de copias de RNA /ml.). Los resultados mostraron una reducción significativa en los sobrenadantes de células que habían sido infectadas con partículas virales irradiadas por luz UV en ambos serotipos con respecto al grupo control que consistió en células que fueron infectadas con partículas virales sin tratamiento previo. Por otro lado, la concentración relativa de la proteína no estructural 1 de DENV fue evaluada en esos mismos sobrenadantes. No se detectó actividad de la proteína para ambos serotipos en cada uno de los sobrenadantes de células que fueron infectadas por partículas virales irradiadas por luz UV, en comparación con el grupo control donde la actividad de la proteína se detectó a lo largo de la cinética de infección. La eficacia de la infección también se observó mediante la formación del efecto citopático en el grupo de células infectadas con partículas virales sin tratamiento alguno, con respecto al grupo infectado con partículas expuestas a luz UV, donde no se llegó a observar la formación del efecto citopático. En su conjunto, estos resultados confirmaron la efectividad de nuestro método para inactivar virus y realizar la inducción del priming inmunológico. Resultados similares se obtuvieron al comparar diferentes métodos de inactivación sobre el virus del Zika. Todas las dosis de radiación a las que fue expuesto el virus dieron como resultado reducciones de la antigenicidad de 4 a 6 veces para todos los títulos de virus en comparación con el virus vivo correspondiente según lo determinado por MAC-ELISA. Sin embargo, la estabilidad del ARN se conservó en todas las dosis de irradiación gamma con todos los títulos (Chida, et al., 2021).

Son muchos los factores a considerar en un experimento para evaluar la especificidad del priming inmunológico. Elegir un buen modelo podría acercarnos más a comprender la manera en que opera este mecanismo. Un conocimiento más profundo nos permitirá entender como el reconocimiento previo de un agente patógeno puede inducir un estado protector debido al reconocimiento y almacenamiento y si las respuestas que se dirigen a este son o no específicas.

9.- Conclusiones

1. Los virus pueden replicarse y propagarse de manera eficiente en los tejidos del mosquito sin provocar efectos adversos significativos. En la naturaleza, este tipo de adaptación mutua convierte a los mosquitos en un reservorio ideal para muchos virus que infectan a los seres humanos.
2. Los mosquitos hacen uso de múltiples estrategias inmunes para prevenir secuelas patológicas causadas por una replicación viral eficiente. La respuesta inmune innata del mosquito es un determinante clave para la transmisión exitosa del virus del dengue.
3. Los patógenos son capaces de evolucionar rápidamente para evadir el sistema inmunológico del huésped, creando una presión de selección sobre el huésped para desarrollar nuevas adaptaciones.
4. El sistema inmunitario de los insectos comparte varias características con el sistema inmune adaptativo de los vertebrados.
5. En los mosquitos, el priming inmunológico puede romper el umbral de tolerancia hacia la infección por DENV, maximizando sus mecanismos de defensa y por ende, puede limitar la replicación y transmisión hacia los humanos.
6. El mosquito *Aedes aegypti* tiende a alimentarse de más de un individuo. En este escenario, existe la posibilidad de que el insecto pueda contraer una co-infección o infección secundaria por diferentes serotipos del virus del dengue o por virus de diferentes familias.
7. La co-infección o infección secundaria con más de un serotipo de DENV puede afectar la dinámica de replicación viral debido a la activación de los mecanismos de defensa inmune del insecto.

8. Se observó una protección inmune mejorada en mosquitos *Aedes aegypti* que tienen un reto heterólogo vs. un reto homólogo.
9. El priming inmunológico con dos serotipos del virus del dengue en el mosquito *Aedes aegypti* es inespecífico.
10. La mejora o entrenamiento inmunológico redujo la carga viral (n. de copias de RNA) en mosquitos *Aedes aegypti* después de la exposición oral a la misma dosis con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue.
11. La carga viral de las excretas de mosquitos *Aedes aegypti* con priming inmunológico disminuye en el transcurso de la infección.
12. El serotipo DENV-4 parece ser un buen inductor de priming inmunológico en mosquitos *Aedes aegypti* con respecto al serotipo 2.
13. Independientemente del serotipo con el cuál se realizó la primera infección (Priming) se generó un estado protector en el mosquito *Aedes aegypti* ante una segunda reinfección con cualquiera de los dos serotipos empleados en esta investigación.
14. Uno de los principales problemas con los experimentos de priming inmunológico radica en la heterogeneidad entre los mosquitos infectados y las características genéticas de cada uno de los serotipos con que se realiza el priming inmune.
15. El diseño experimental es fundamental para evaluar los diferentes atributos del priming inmunológico.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai S. (2010). **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Abraham, E.G. & Jacobs-Lorena, M. (2004). **Mosquito midgut barriers to malaria parasite development**. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7):667-71. DOI: 10.1016/j.ibmb.2004.03.019.
- Ahmad, Z. & Poh, C.L. **The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus**. *International journal of medical sciences*, 24;16(3):355-365. DOI: 10.7150/ijms.29938.
- Alcaraz-Estrada, S.L., Yocupicio-Monroy, M. & Del Angel, R.M. (2010). **Insights into dengue virus genome replication**. *Future Virology*, 5(5): 575-592. DOI: 10.2217/fvl.10 .49
- Anoop, M., Issac, A., Mathew, T., Philip, S., Kareem, N.A., Unnikrishnan, R. & Sreekumar, E. (2010). **Genetic characterization of dengue virus serotypes causing concurrent infection in an outbreak in Ernakulam, Kerala, South India**. *Indian journal of experimental biology*, 48(8):849-57.
- Bartenschlager, R. & Miller, S. (2008). **Molecular aspects of Dengue virus replication**. *Future Microbiology*, 3(2): 155-165. DOI: 10.2217/17460913.3.2.155
- Beckage, N.E. (2008). **Insect Immunology**. Oxford: Academic Press.
- Bennett, K.E., Flick, D., Fleming, K.H., Jochim, R., Beaty, B.J. & Black, W.C. (2005). **Quantitative trait loci that control Dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti***. *Genetics*, 170(1): 185–194. DOI: 10.1534/genetics.104.035634
- Beutler, B. (2003). **Not "molecular patterns" but molecules**. *Immunity*, 19(2):155-6. DOI: 10.1016/s1074-7613(03)00212-7. PMID: 12932347.
- Bharaj, P., Chahar, H.S., Pandey, A., Diddi, K., Dar, L., Guleria, R., Kabra, S.K. & Broor, S. (2006). **Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak of dengue in 2006 in Delhi, India**. *Virology journal*, 9;5:1. DOI: 10.1186/1743-422X-5-1.
- Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J. & Hay, S.I. (2013). **The global distribution and burden of dengue**. *Nature*, 496 (7446), 504-507. DOI: 10. 1038/nature12060

- Blair, C.D. & Olson, K.E. (2015). **The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions.** *Viruses*, 17;7(2):820-43. DOI: 10.3390/v7020820.
- Bonizzoni, M., Dunn, W.A., Campbell, C.L., Olson, K.E., Dimon, M.T., Marinotti, O. & James, A.A. (2011). **RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*.** *BMC Genomics*, 28;12:82. DOI: 10.1186/1471-2164-12-82.
- Bouallegui Y. (2019). **Immunity in mussels: An overview of molecular components and mechanisms with a focus on the functional defenses.** *Fish & shellfish immunology*, 89:158-169. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.03.057
- Boraschi, D. & Italiani, P. (2018). **Innate Immune Memory: Time for Adopting a Correct Terminology.** *Frontiers in immunology*, 19;9:799. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00799.
- Brey, P.T. (1998). **The contributions of the Pasteur school of insect immunity.** In: Brey PT, Hultmark D (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (pp. 1-39). London: Chapman and Hall.
- Brown, S., Hu, N. & Hombría, J.C. (2001). **Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*.** *Current biology*, 30;11(21):1700-5. DOI: 10.1016/s0960-9822(01)00524-3.
- Brucker, R.M. & Bordenstein, S.R. (2012). **The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities.** *Evolution*, 66(2):349-62. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x.
- Burivong, P., Pattanakitsakul, S.N., Thongrunkiat, S., Malasit, P. & Flegel, T.W. (2004). **Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with *Aedes albopictus* densovirus (AaIDNV).** *Virology*, 24;329(2):261-9. DOI: 10.1016/j.virol.2004.08.032. PMID: 15518806.
- Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G. & Brandt, W.E. (1989). **Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera.** *The Journal of general virology*, 70 (Pt 1): 37-43. DOI: 10.1099/0022-1317-70-1-37
- Carrington, C.V., Foster, J.E., Pybus, O.G., Bennett, S.N. & Holmes, E.C. (2005). **Invasion and maintenance of dengue virus type 2 and type 4 in the Americas.** *Journal of virology*, 79(23):14680-7. DOI: 10.1128/JVI.79.23.14680-14687.2005.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2020). **Dengue. Epidemiology**. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>
- Chatel-Chaix, L. & Bartenschlager, R. (2014). **Dengue Virus- and Hepatitis C Virus-Induced Replication and Assembly Compartments: The Enemy Inside--Caught in the Web**. *Journal of virology*, 88 (11): 5907–5911. DOI: 10.1128/JVI.03404-13
- Chiou, C.T., Hu, C.C.A., Chen, P.H., Liao, C.L., Lin, Y.L. & Wang, J.J. (2003). **Association of Japanese encephalitis virus NS3 protein with microtubules and tumour susceptibility gene 101 (TSG101) protein**. *The Journal of general virology*, 84 (Pt 10). DOI: 10.1099/vir.0.19201-0
- Clyde, K., Kyle, J.L. & Harris, E. (2006). **Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis**. *Journal of Virology*, 80 (23): 11418-11431. DOI: 10.1128/JVI.01257-06
- Colombo, E.T., Vedovello, D., Mondini, A., Negri Reis, F., Ferras Cury, A.A., Hulder de Oliveira, F., Arão Antonio Cruz, L.E., Vieira de Moraes Bronzoni, R. & Lacerda Nogueira, M. (2013). **Co-infection of dengue virus by serotypes 1 and 4 in patients from medium sized city from Brazil**. *Reviews of Institute of Medicine and Tropical Diseases, Sao Paulo* 55, 275–281.
- Contreras-Garduño, J., Rodriguez, M.C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J. & Lanz-Mendoza, H. (2015). **Plasmodium berghei induced priming in Anopheles albimanus independently of bacterial co-infection**. *Developmental and Comparative Immunology*, 52 (2), 172-181. DOI: 10.1016 / j.dci.2015.05.004.
- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., Canales-Lazcano, J. (2016). **Insect immune priming: ecology and experimental evidences**. *Ecological entomology*, 41 (4), 351-366. DOI: 10.1111/een.12300
- Cooper, E.L. (1992). **Invertebrate immunity**. *Scandinavian Journal of Immunology*, 35, 247–266.
- Cooper, M.D. & Alder, M.N. (2006). **The evolution of adaptive immune systems**. *Cell*, 124(4):815-22. DOI:10.1016/j.cell.2006.02.001.
- Cooper, D. & Eleftherianos, I. (2017). **Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges**. *Frontiers in immunology*, 9;8:539. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00539.

- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T.M., Higa, L.M., Castanho, M.A. & Da Poian, A.T. (2015). **Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells.** FEMS microbiology reviews, 39(2):155-70. DOI: 10.1093/femsre/fuu004.
- De Almeida, H., Bastos, I. M., Ribeiro, B.M., Maigret, B. & Santana, J.M. (2013). **New binding site conformations of the dengue virus NS3 protease accessed by molecular dynamics simulation.** Public Library of Science one, 8 (8). DOI: 10.1371/journal.pone.0072402
- Deerberg, A., Willkomm, S. & Restle, T. (2013). **Minimal mechanistic model of siRNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute 2 protein.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 29;110(44):17850-5. DOI: 10.1073/pnas.1217838110.
- DeLotto, Y. & DeLotto, R. (1998). **Proteolytic processing of the Drosophila Spätzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity.** Mechanisms of development, 72(1-2):141-8. DOI: 10.1016/s0925-4773(98)00024-0.
- Dhanoa, A., Hassan, S.S., Ngim, C.F., Lau, C.F., Chan, T.S., Adnan, N.A., Eng, W.W., Gan, H.M. & Rajasekaram, G. (2016). **Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters.** BMC Infectious Diseases, 11;16(1):406. DOI: 10.1186/s12879-016-1731-8.
- Diamond, M.S., Edgil, D., Roberts, T.G., Lu, B. & Harris, E. (2000). **Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains.** Journal of virology, 74 (14): 7814-7823. DOI: 10.1128/jvi.74.17.7814-7823.2000
- Domingo, E. & Holland, J.J. (1997). **RNA virus mutations and fitness for survival.** Annual review of microbiology, 51:151-78. DOI: 10.1146/annurev.micro.51.1.151.
- Duneau, D.F., Kondolf, H.C., Im, J.H. (2017). **The Toll pathway underlies host sexual dimorphism in resistance to both Gram-negative and Gram-positive bacteria in mated *Drosophila*.** BMC biology, 21;15(1):124. DOI: 10.1186/s12915-017-0466-3.
- Ekwudu, O., Marquart, L., Webb, L., Lowry, K.S., Devine, G.J., Hugo, L.E. & Frentiu, F.D. (2020). **Effect of Serotype and Strain Diversity on Dengue Virus Replication in Australian Mosquito Vectors.** Pathogens, 18;9(8):668. DOI: 10.3390/pathogens9080668.
- Eleftherianos, I. & Revenis, C. (2011). **Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis.** Journal of innate immunity, 3(1):28-33. DOI: 10.1159/000321931.

- Elshuber, S., Allison, S.L., Heinz, F.X. & Mandl, C.W. (2003). **Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus.** The Journal of general virology, 84 (Pt 1): 183-191. DOI: 10.1099/vir.0.18723-0
- Ferro, K., Peuß, R., Yang, W., Rosenstiel, P., Schulenburg, H. & Kurtz, J. (2019). **Experimental evolution of immunological specificity.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 8;116(41):20598-20604. DOI: 10.1073/pnas.1904828116.
- Figueiredo, R.M., Naveca, F.G., Oliveira, C.M., Bastos, M. de S., Mourão, M.P., Viana, S. de S., Melo, M.do N., Itapirema, E.F., Saatkamp, C.J. & Farias, I.P. (2011). **Co-infection of Dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 53(6):321-3. DOI: 10.1590/s0036-46652011000600004.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** Nature, 19;391(6669):806-11. DOI: 10.1038/35888.
- Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Lequime, S. & Lambrechts, L. (2016). **Excretion of dengue virus RNA by *Aedes aegypti* allows non-destructive monitoring of viral dissemination in individual mosquitoes.** Scientific Reports, 27;6:24885. DOI: 10.1038/srep24885.
- Forattini, O.P. (2002). **Culicidologia médica: Identificacao, biologia e epidemiologia.** Vol. 2, EDUSP, Sao Paulo, 864 p.
- Fukutani, K.F., Kasprzykowski, J.I., Paschoal, A.R., Gomes, M.d.S., Barral, A., De Oliveira, C.I., Ramos, P.I.P. & Queiroz, A.T.L.D. (2017). **Meta-analysis of *Aedes aegypti* expression datasets: Comparing virus infection and blood fed transcriptomes to identify markers of virus presence.** Frontiers in bioengineering and biotechnology, 11;5:84. DOI: 10.3389/fbioe.2017.00084.
- Gadelha, D.P. & Toda, A.T. (1985). **Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*.** Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais, 37, 29-36.
- Goic. B., Stapleford, K.A., Frangeul, L., Doucet, A.J., Gausson, V., Blanc, H., Schemmel-Jofre, N., Cristofari, G., Lambrechts, L., Vignuzzi, M. & Saleh, M.C. (2016). **Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection.** Nature communications, 1;7:12410. DOI: 10.1038/ncomms12410.
- González-Acosta, S., Baca-González, V., Asensio-Calavia, P., Otazo-Pérez, A., López, M.R., Morales-delaNuez, A. & Pérez de la Lastra, J.M. (2022). **Efficient Oral Priming of *Tenebrio***

- molitor Larvae Using Heat-Inactivated Microorganisms.** *Vaccines* (Basel), 11;10(8):1296. DOI: 10.3390/vaccines10081296.
- Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G.J.M., Van Der Meer, J.W.M., Conrath, U. & Netea, M.G. (2018). **Innate immune memory: An evolutionary perspective.** *Immunological reviews*, 283(1):21-40. DOI: 10.1111/imr.12647.
- Grant, D., Tan, G.K., Qing, M., Ng, J.K., Yip, A., Zou, G., Xie, X., Yuan, Z., Schreiber, M.J., Schul, W., Shi, P.Y. & Alonso, S. **A single amino acid in nonstructural protein NS4B confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis.** *Journal of virology*, 85(15):7775-87. DOI: 10.1128/JVI.00665-11.
- Gubler, D.J., Nalim, S., Tan, R., Saipan, H. & Sulianti Saroso, J. (1979). **Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 28(6):1045-52. DOI: 10.4269/ajtmh.1979.28.1045.
- Gubler, D.J., Kuno, G., Sather, G.E. & Waterman, S.H. (1985). **A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34(1):170-3. DOI: 10.4269/ajtmh.1985.34.170.
- Gutiérrez-Barbosa, H., Castañeda, N.Y. & Castellanos, J.E. (2020). **Differential replicative fitness of the four dengue virus serotypes circulating in Colombia in human liver Huh7 cells.** *The Brazilian journal of infectious diseases*, 24(1):13-24. DOI: 10.1016/j.bjid.2019.11.003.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C., Yoksan, S. & Peeling, R.W. (2010). **Dengue: a continuing global threat.** *Nature Reviews Microbiology*, 8 (120), 7-16. DOI: 10.1038/nrmicro2460
- Guzman, M.G., Gubler, D.J., Izquierdo, A., Martinez, E. & Halstead, S. (2016). **Dengue infection.** *Nature Reviews Disease Primers*, 2(16055). DOI: 10.1038/nrdp.2016.55.
- Halstead, S. B. (2008). **Dengue virus-mosquito interactions.** *Annual Review of Entomology*, 53: 273-291. DOI: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093326
- Harrington, L.C., Edman, J.D. & Scott, T.W. (2001). **Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood?** *Journal of Medical Entomology*, 38(3):411-22. DOI: 10.1603/0022-2585-38.3.411.
- Heinz, F.Z. & Allison, S.L. (2003). **Flavivirus structure and membrane fusion.** *Advances in virus research*, 59:63-97. DOI: 10.1016/s0065-3527(03)59003-0.

- Henchal, E.A. & Putnak, J.R. (1990). **The dengue viruses**. *Clinical microbiology reviews*, 3(4): 376-396. DOI: 10.1128/cmr.3.4.376
- Holmes, E.C. & Burch, S.S. (2000). **The causes and consequences of genetic variation in dengue virus**. *Trends in microbiology*, 8(2):74-7. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01669-8. PMID: 10664600.
- Holmes, E.C. & Twiddy, S.S. (2003). **The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus**. *Infection, genetics and evolution*, 3(1):19-28. DOI: 10.1016/s1567-1348(03)00004-2.
- Jacobs, C.G.C., Gallagher, J.D., Evison, S.E.F., Heckel, D.G., Vilcinskas, A. & Vogel, H. (2017). **Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*)**. *Developmental and comparative immunology*, 70:1-8. DOI: 10.1016/j.dci.2016.12.007.
- Janeway, A.J., Travers, P. & Walport, M. (2001). **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. London: Garland.
- Janeway, C.A. Jr. & Medzhitov, R. (2002). **Innate immune recognition**. *Annual review of immunology*, 20:197-216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- Jansen, C.C. & Beebe, N.W. (2010). **The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next**. *Microbes and infection*, 12(4):272-9. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.12.011.
- Jones, C.T., Ma, L., Burgner, J.W., Groesch, T.D., Post, C.B. & Kuhn, R.J. (2003). **Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein**. *Journal of virology*, 77 (12): 7143–7149. DOI: 10.1128/JVI.77.12.7143-7149.2003
- Juliano, S.A. & Lounibos, L.P. (2005). **Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health**. *Ecology letters*, 8(5):558-74. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00755.
- Jupatanakul, N., Sim, S., Angleró-Rodríguez, Y.I., Souza-Neto, J., Das, S., Poti, K.E., Rossi, S.L., Bergren, N., Vasilakis, N. & Dimopoulos, G. (2017). **Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus**. *PLoS neglected tropical diseases*, 12;11(1):e0005187. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005187.
- Kalyan, S., Bazett, M., Sham, H.P., Bosiljic, M., Luk, B., Dhanji, S., Costa, A.M., Wong, S.W.Y., Netea, M.G., Mullins, D.W. & Gunn, H. (2020). **Distinct inactivated bacterial-based immune modulators vary in their therapeutic efficacies for treating disease based on the organ site of pathology**. *Scientific Reports*, 3;10(1):5901. DOI: 10.1038/s41598-020-62735-z.

- Katzelnick, L.C., Fonville, J.M., Gromowski, G.D., Bustos-Arriaga, J., Green, A., James, S.L., Lau, L., Montoya, M., Wang, C., VanBlargan, L.A., Russell, C.A., Thu, H.M., Pierson, T.C., Buchy, P., Askov, J.G., Muñoz-Jordán, J.L., Vasilakis, N., Gibbons, R.V., Tesh, R.B., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Durbin, A., Simmons, C.P., Holmes, E.C., Harris, E., Whitehead, S.S. & Smith, D. J. (2015). **Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes.** *Science*, 349 (6254): 1338-1343. DOI: 10.1126/science.aac5017.
- Kelly, B. & O'Neill, L.A. (2015). **Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity.** *Cell research*, 25(7):771-84. DOI: 10.1038/cr.2015.68.
- Khoo, C.C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E. & Franz, A.W.E. (2010). **The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*.** *BMC microbiology*, 28;10:130. DOI: 10.1186/1471-2180-10-130.
- Kiermayr, S., Kofler, R.M., Mandl, C.W., Heinz, F.X. & Messner, P. (2004). **Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles Isolation of Capsid Protein Dimers from the Tick-Borne Encephalitis Flavivirus and In Vitro Assembly of Capsid-Like Particles.** *Journal of virology*, 78 (15): 8078–8084. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8078
- Klein, J. (1989). **Are invertebrates capable of anticipatory immune responses?** *Scandinavian Journal of Immunology*, 29 (5), 499–505. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1989.tb01152
- Kopan, R. & Ilagan, M.X.G. (2009). **The canonical notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism.** *Cell*, 17;137(2):216-33. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C. & Smith, D.R. (2010). **Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells.** *Virology*, 406: 149–161. DOI: 10.1016/j.virol.2010.07.015.
- Kulkarni, A., Pandey, A., Trainor, P., Carlisle, S., Chhilar, J.S., Yu, W., Moon, A. & Xu, J. (2021). **Trained Immunity in *Anopheles gambiae*: Antibacterial Immunity Is Enhanced by Priming via Sugar Meal Supplemented With a Single Gut Symbiotic Bacterial Strain.** *Frontiers in Microbiology*, 30;12:649213. DOI: 10.3389/fmicb.2021.649213.
- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P., Dubey, S.K., Kumar, R., Shrinet, J. & Sunil, S. (2018). **Mosquito Innate Immunity.** *Insects*, 8;9(3):95. DOI: 10.3390/insects9030095.
- Kuno, G., Brooks, J.B. & Wycoff, B.J. (1984). **Changes in hydroxy and carboxylic acid compositions in the supernatant fluids of mosquito cell cultures infected with dengue**

- viruses.** Journal of Invertebrate Pathology, 44(3):256-62. DOI: 10.1016/0022-2011(84)90022-3.
- Kuno, G., Chang, G.J., Tsuchiya, K.R., Karabatsos, N. & Cropp, C.B. (1998). **Phylogeny of the genus Flavivirus.** Journal of virology, 72(1):73-83. DOI: 10.1128/JVI.72.1.73-83.1998.
- Kurtz, J. & Franz, K. (2003). **Evidence for memory in invertebrate immunity.** Nature, 425 (6953), 37-38. DOI: 10.1038 / 425037a
- Kurtz, J. (2005). **Specific memory within innate immune systems.** Trends in Immunology, 26 (4), 186-192. DOI: 10.1016 / j.it.2005.02.001
- Laille, M., Deubel, V. & Sainte-Marie, F.F. **Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction.** Journal of medical virology, 34(1):51-4. DOI: 10.1002/jmv.1890340109.
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R.G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J.H., Jarman, R.G. & Scott, T.W. (2009). **Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors.** BMC evolutionary biology, 9;9:160. DOI: 10.1186/1471-2148-9-160.
- Lanz-Mendoza, H. & Contreras-Garduño, J. (2022). **Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms.** Developmental and comparative immunology, 127:104285. DOI: 10.1016/j.dci.2021.104285.
- Lazzaro, B.P. & Little, T.J. (2009) **Immunity in a variable world.** Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences 364: 15–26.
- Laughlin, C.A., Morens, D.M., Cassetti, M.C., Costero-Saint Denis, A., San Martin, J.L., Whitehead, S.S. & Fauci, A. S. (2012). **Dengue research opportunities in the Americas.** The Journal of infectious diseases, 206 (7): 1121-1127. DOI: 10.1093/infdis/jis351.
- Lee, WS., Webster, J.A., Madzokere, E.T., Stephenson, E.B. & Herrero, L.J. (2019). **Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection.** Parasites & vectors, 11;12(1):165. DOI: 10.1186/s13071-019-3433-8.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M. & Hoffmann, J.A. (1997). **Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 23;94(26):14614-9. DOI: 10.1073/pnas.94.26.14614.

- Limjindaporn, T., Wongwiwat, W., Noisakran, S., Srisawat, C., Netsawang, J., Puttikhunt, C., Kasinrerak, W., Avirutnan, P., Thiemmecca, S., Sriburi, R., Sittisombut, N., Malasit, P., Yenchitsomanus, P.T. (2009). **Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production.** *Biochemical and biophysical research communications*, 379 (2): 196-200. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.070.
- Lin, Y.C., Chen, J.C., Morni, W.Z., Putra, D.F., Huang, C.L., Li, C.C. & Hsieh, J.F. (2013). **Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*.** *PLoS One*, 22;8(7):e69722. DOI: 10.1371/journal.pone.0069722.
- Little, T.J. & Kraaijeveld, A.R. (2004). **Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates.** *Trends in ecology & evolution*, 19(2):58-60. DOI: 10.1016/j.tree.2003.11.011.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M. & Kepler, T.B. (2004). **Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood.** *Immunological reviews*, 198:10-24. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x.
- Loroño-Pino, M.A., Cropp, C.B., Farfán, J.A., Vorndam, A.V., Rodríguez-Angulo, E.M., Rosado-Paredes, E.P., Flores-Flores, L.F., Beaty, B.J. & Gubler, D.J. (1999). **Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 61(5):725-30. DOI: 10.4269/ajtmh.1999.61.725.
- Lozovei, A.L. (2001). **Microhabitats de mosquitos (Diptera, Culicidae) em internódios de taquara na mata atlântica, Paraná, Brasil.** *Iheringia, Sección Zoología*, 90:3–13.
- Ma, L., Jones, C.T., Groesch, T.D., Kuhn, R.J. & Post, C.B. (2004). **Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10):3414-3419. DOI: 10.1073/pnas.0305892101
- Manfredini, F., Beani, L., Taormina, M. & Vannini, L. (2010). **Parasitic infection protects wasp larvae against a bacterial challenge.** *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 12(10):727-35. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.05.001
- Medina-Gómez, H., Farriols, M., Santos, F., González-Hernández, A., Torres-Guzmán, J.C., Lanz, H. & Contreras-Garduño, J. (2018). **Pathogen-produced catalase affects immune priming: A potential pathogen strategy.** *Microbial pathogenesis*, 125:93-95. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.09.012.

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A. Jr. (1997). **A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature*, 24;388(6640):394-7. DOI: 10.1038/41131.
- Mendoza, Y., Salas-Benito., J.S., Lanz-Mendoza, H., Hernandez-Martinez, S. & del Angel, R.M. (2002). **A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 67: 76: 76-84. DOI: 10.4269/ajtmh.2002.67.76
- Michel, T., Reichhart, JM., Hoffmann, J. & Royet, J. (2001). ***Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein.** *Nature*, 13;414(6865):756-9. DOI: 10.1038/414756a.
- Milutinović, B. & Kurtz, J. (2016). **Immune memory in invertebrates.** *Seminars in immunology*, 28(4):328-42. DOI: 10.1016/j.smim.2016.05.004.
- Mohammadie Kojour, A. M., Baliarsingh, S., Jang, H.A., Yun, K., Park, K.B., Lee, J.E., Han, Y.S., Patnaik, B.B. & Jo, Y.H. (2021). **Current knowledge of immune priming in invertebrates, emphasizing studies on *Tenebrio molitor*.** *Developmental and comparative immunology*, 127:104284. DOI: 10.1016/j.dci.2021.104284.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. (2000). **Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers.** *Science*, 10;290(5494):1166-8. DOI: 10.1126/science.290.5494.1166.
- Moret, Y. & Siva-Jothy, M.T. (2003). **Adaptive innate immunity. Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*.** *Biological sciences*. The Royal Society, 270 (1532), 2475–2480. DOI: 10.1098 / rspb.2003.2511
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J. & Rossmann, M.G. (2005). **A structural perspective of the flavivirus life cycle.** *Nature reviews. Microbiology*, 3(1):13-22. DOI: 10.1038/nrmicro1067.
- Muller, D.A. & Young, P.R. (2013). **The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker.** *Antiviral research*, 98 (2): 192-208. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008
- Muñoz, M.L., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R. & Ortega, A. (1998). **Putative dengue virus receptors from mosquito cells.** *FEMS Microbiology Letter*, 168: 251–258. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13281.x

- Muñoz-Jordan, J.L., Laurent-Rolee, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I. & Garcia-Satre, A. (2005). **Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses.** Journal of virology, 79 (13): 8004-8013. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8004-8013.2005
- Muñoz-Jordán, J.L. & Santiago, G.A. (2014). **Inconclusive reverse transcription-PCR assay comparison for dengue virus detection and serotyping.** Journal of clinical microbiology, 52 (5): 1800. DOI: 10.1128/JCM.03420-13.
- Murphy, K.M., Travers, P. & Walport, M. (2007). **Janeway's Immunobiology.** Garland Science, New York.
- Nayak, V., Dessau, M., Kucera, K., Anthony, K., Ledizet, M. & Modis, Y. (2009). **Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion.** Journal of virology, 83 (9): 4338-4344. DOI: 10.1128/JVI.02574-08.
- Netea, M.G., Quintin, J. & van der Meer, J.W. (2011). **Trained immunity: a memory for innate host defense.** Cell Host Microbe, 19;9(5):355-61. DOI: 10.1016/j.chom.2011.04.006.
- Netea, M.G. & van der Meer, J.W. **Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering.** Cell Host Microbe, 8;21(3):297-300. DOI: 10.1016/j.chom.2017.02.003.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E. & Wileman, T. (2007). **A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication.** Advances in virus research, 70: 101-182. DOI: 10.1016/S0065-3527(07)70004-0
- NOM-032-SSA2-2014. **Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.** Recuperado de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015
- Novelo, M., Hall, M.D., Pak, D., Young, P.R., Holmes, E.C. & McGraw, E.A. (2019). **Intra-host growth kinetics of dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*.** PLoS pathogens, 2;15(12):e1008218. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008218.
- Novelo, M., Audsley, M.D. & McGraw, E.A. (2021). **The effects of DENV serotype competition and co-infection on viral kinetics in *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes aegypti* mosquitoes.** Parasites & vectors, 9;14(1):314. DOI: 10.1186/s13071-021-04816-0.
- Novoa, R.R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H. & Risco, C. (2005). **Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis.** Biology of the cell, 97 (2): 147-172. DOI: 10.1042/BC20040058

- Oppert, B., Dowd, S.E., Bouffard, P., Li, L., Conesa, A., Lorenzen, M.D., Toutges, M., Marshall, J., Huestis, D.L., Fabrick, J., Oppert, C. & Jurat-Fuentes, J.L. (2012). **Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin.** PLoS One, 7(4):e34624. DOI: 10.1371/journal.pone.0034624.
- Parikh, G.R., Oliver, J.D. & Bartholomay L.C. (2009). **A haemocyte tropism for an arbovirus.** The Journal of general virology, 90(Pt 2):292-296. DOI: 10.1099/vir.0.005116-0.
- Perera, R. & Kuhn, R.J. **Structural proteomics of dengue virus.** Current opinion in microbiology, 11(4): 369-377. DOI: 10.1016/j.mib.2008.06.004.
- Pham, L.N., Dionne, M.S., Shirasu-Hiza, M. & Schneider, D.S. (2007). **A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes.** PLoS Pathogens, 3 (3), 1-8. DOI: 10.1371 / journal.ppat.0030026
- Qi, R.F., Zhang, L. & Chi, C. (2008). **Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design.** Acta biochimica et biophysica Sinica, 40 (2): 90-101. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008. 00382.x
- Quintero-Gil, D.C., Ospina, M., Osorio-Benitez, J.E. & Martinez-Gutierrez, M. (2014). **Differential replication of dengue virus serotypes 2 and 3 in coinfections of C6/36 cells and *Aedes aegypti* mosquitoes.** Journal of infection in developing countries, 14;8(7):876-84. DOI: 10.3855/jidc.3978.
- Quintero-Gil, D.C., Uribe-Yepes, A., Ospina, M., Díaz, F.J. & Martinez-Gutierrez, M. (2018). **Differences in the replicative capacities of clinical isolates of dengue virus in C6/36 cells and in urban populations of *Aedes aegypti* from Colombia, South America.** The Brazilian journal of infectious diseases, 22(4):257-272. DOI: 10.1016/j.bjid.2018.07.010.
- Ramirez, J.L. & Dimopoulos, G. (2010). **The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes.** Developmental and comparative immunology, 34(6):625-9. DOI: 10.1016/j.dci.2010.01.006.
- Reyes-del Valle, J., Salas-Benito, J., Soto-Acosta, R. & Del Angel, R.M. (2014). **Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism.** Current Tropical Medicine Reports, (1):36–43. DOI: 10.1007/s40475-013-0002-7
- Rico-Hesse R. (2003). **Microevolution and virulence of dengue viruses.** Advances in virus research, 59:315-41. DOI: 10.1016/s0065-3527(03)59009-1.

- Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J. & Smit, J.M. (2010). **Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity.** Cellular and molecular life sciences, 67 (16): 2773-2786. DOI: 10.1007/s00018-010-0357-z.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. (2003). **Ecological immunology: an invertebrate perspective.** Science, 301 (5632), 472–475. DOI: 10.1126 / science.1080623
- Rowley, A.F. & Powell, A. (2007). **Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?** Journal of immunology, 1;179(11):7209-14. DOI: 10.4049/jimmunol.179.11.7209.
- Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V. & Smith, D.R. (2006). **Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein.** Intervirology, 49: 161–172. DOI: 10.1159/000089377
- Salazar, M.I., Richardson, J.H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K.E. & Beaty, B.J. (2007). **Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes.** BMC microbiology, 30;7:9. DOI: 10.1186/1471-2180-7-9.
- Salas-Benito, J., Reyes-Del Valle, J., Salas-Benito, M., Ceballos-Olvera, I., Mosso, C. & del Angel, R.M. (2007). **Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein.** The American journal of tropical medicine and hygiene, 77: 283-290.
- Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T. & Gamarnik, A. V. (2009). **Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation.** PLoS pathogens, 5 (10). DOI: 10.1371/journal.ppat.1000632.
- Sánchez, I.J. & Ruiz, B.H. (1996). **A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice.** The Journal of general virology, 77 (Pt 10):2541-5. DOI: 10.1099/0022-1317-77-10-2541.
- Sánchez-Vargas, I., Scott, J.C., Poole-Smith, B.K., Franz, A.W.E., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K.E. & Blair, C.D. (2009). **Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway.** PLOS Pathogens, 5(2):e1000299. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000299.
- Satyavathi, V.V., Minz, A. & Nagaraju, J. (2014). **Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects.** Cellular signaling, 26(8):1753-63. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.02.024.

- Schmid-Hempel, P. (2011). **Evolutionary Parasitology**. Oxford University Press, New York. pp 536.
- Schulenburg, H., Boehnisch, C. & Michiels, N.K. (2007). **How do invertebrates generate a highly specific innate immune response?** *Molecular Immunology*, 44 (13), 3338–3344. DOI: 10.1016/j.molimm.2007.02.019
- Scott, T.W. & Takken, W. (2012). **Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission.** *Trends in parasitology*, 28(3):114-21. DOI: 10.1016/j.pt.2012.01.001.
- Senaratne, U.T.N., Muruganathan, K., Sirisena, P.D.N.N., Carr, J.M. & Noordeen, F. (2020). **Dengue virus co-infections with multiple serotypes do not result in a different clinical outcome compared to mono-infections.** *Epidemiology and infection*, 29;148:e119. DOI: 10.1017/S0950268820000229.
- Serrato-Salas, J., Izquierdo-Sánchez, J., Argüello, M., Conde, R., Alvarado-Delgado, A. & Lanz-Mendoza, H. (2018). ***Aedes aegypti* antiviral adaptive response against DENV-2.** *Developmental and comparative immunology*, 84:28-36. DOI: 10.1016/j.dci.2018.01.022.
- Serrato-Salas, J., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Condé, R., Alvarado-Delgado, A., Zumaya-Estrada F. & Lanz-Mendoza, H. (2018). ***De novo* DNA synthesis in *Aedes aegypti* midgut cells as a complementary strategy to limit dengue viral replication.** *Frontiers in microbiology*, 26;9:801. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00801.
- Sheehan, G., Farrell, G. & Kavanagh, K. (2020). **Immune priming: the secret weapon of the insect world.** *Virulence*, 11(1):238-246. DOI: 10.1080/21505594.2020.1731137.
- Shu, P. Y. & Huang, J. H. (2004). **Current Advances in Dengue Diagnosis.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11 (4): 642-650. DOI: 10.1128/CDLI.11.4.642-650.2004
- Sim, S., Ramirez, J.L. & Dimopoulos, G. (2012). **Dengue virus infection of the *Aedes aegypti* salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior.** *PLoS pathogens*, 8(3):e1002631. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002631.
- Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J.L., Kang, S., Romero-Vivas, C.M., Mohammed, H. & Dimopoulos, G. (2013). **Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions.** *PLoS neglected tropical diseases*, 4;7(7):e2295. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002295.

- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2022). **Panorama Epidemiológico de Dengue**. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2022>
- Smith, K.M., Nanda, K., Spears, C.J., Ribeiro, M., Vancini, R., Piper, A., Thomas, G.S., Thomas, M.E., Brown, D.T. & Hernandez, R. (2011). **Structural mutants of dengue virus 2 transmembrane domains exhibit host-range phenotype**. *Virology journal*, 8 (289). DOI: 10.1186/1743-422X-8-289
- Souza-Neto, J.A., Sim, S. & Dimopoulos, G. (2009). **An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20;106(42):17841-6. DOI: 10.1073/pnas.0905006106.
- Suaya, J.A., Shepard, D.S., Siqueira, J.B., Martelli, C.T., Lum, L.C., Tan, L.H., Jiamton, S., Garrido, F., Montoya, R., Armien, B., Huy, R., Castillo, L., Caram, M., Sah, B.K., Sughayvar, R., Tyo, K.R. & Halstead, S.B. (2009). **Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80 (5), 846-855. DOI: 10.4269/AJTMH.2009.80.846
- Sun, J. & Deng, W-M. (2005). **Notch-dependent downregulation of the homeodomain gene cut is required for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in *Drosophila* follicle cells**. *Development*, 132(19):4299-308. DOI: 10.1242/dev.02015.
- Surasombatpattana, P., Hamel, R., Patramool, S., Luplertlop, N., Thomas, F., Desprès, P., Briant, L., Yssel, H. & Missé, D. (2011). **Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses**. *Infection, genetics and evolution*, 11(7):1664-73. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.06.009.
- Tazeen, A., Afreen, N., Abdullah, M., Deebe, F., Haider, S.H., Kazim, S.N., Ali, S., Naqvi, I.H., Broor, S., Ahmed, A. & Parveen, S. (2017). **Occurrence of co-infection with dengue viruses during 2014 in New Delhi, India**. *Epidemiology and infection*, 145(1):67-77. DOI: 10.1017/S0950268816001990.
- Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B. & Moret, Y. (2019). **Trans-generational Immune Priming in Invertebrates: Current Knowledge and Future Prospects**. *Frontiers in immunology*, 14;10:1938. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01938.
- Thavara, U., Siriyasatien, P., Tawatsin, A., Asavadachanukorn, P., Anantapreecha, S., Wongwanich, R. & Mulla, M.S. **Double infection of heteroserotypes of dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and**

- serological features of dengue viruses found in patients in southern Thailand.** The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, 37(3):468-76.
- Tsang, T.K., Ghebremariam, S.L., Gresh, L., Gordon, A., Halloran, M.E., Katzelnick, L.C., Rojas, D.P., Kuan, G., Balmaseda, A., Sugimoto, J., Harris, E., Longini Jr, I.M. & Yang, Y. (2019). **Effects of infection history on dengue virus infection and pathogenicity.** Nature communications, 18;10(1):1246. DOI: 10.1038/s41467-019-09193-y.
- Tuiskunen Bäck, A. & Lundkvist, Å. (2013). **Dengue viruses – an overview.** Infection ecology & epidemiology, 30;3. DOI: 10.3402/iee.v3i0.19839.
- Urbanowski, M.D., Ilkow, C.S. & Hobman, T.C. (2008). **Modulation of signaling pathways by RNA virus capsid proteins.** Cellular signaling, 20 (7): 1227-1236. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.12.018
- Van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Waarts, B.L., Van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R.J., Wilschut, J., Zhuang, X. & Smit, J.M. (2007). **Characterization of the Early Events in Dengue Virus Cell Entry by Biochemical Assays and Single-Virus Tracking.** Journal of virology, 81 (21): 12019–12028. DOI: 10.1128/JVI.00300-07
- Van Der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, Van Der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X. & Smit, J.M. (2008). **Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single particle tracking in living cells.** PLoS pathogens, 4 (12). DOI: 10.1371/journal.ppat.1000244.
- Vargas, V., Moreno-García, M., Duarte-Elguea, E. & Lanz-Mendoza, H. (2016). **Limited specificity in the Injury and infection priming against bacteria in *Aedes aegypti* mosquitoes.** Frontiers in microbiology, 22;7:975. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00975.
- Vargas, V., Cime-Castillo, J. & Lanz-Mendoza, H. (2020). **Immune priming with inactive dengue virus during the larval stage of *Aedes aegypti* protects against the infection in adult mosquitoes.** Scientific Reports, 21;10(1):6723. DOI: 10.1038/s41598-020-63402-z.
- Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K.A., Holmes, E.C. & Weaver, S.C. (2011). **Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health.** Nature reviews. Microbiology, 13;9(7):532-41. DOI: 10.1038/nrmicro2595.
- Vaughn, D.W., Green, S., Kalajanoorj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorns, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F.A. & Nisalak, A. (2000). **Dengue viremia titer, antibody, response pattern and virus serotype correlate with disease severity.** The Journal of Infectious Diseases, 181 (1), 2-9. DOI: 10. 1086/315215

- Velandia, M.L. & Castellanos, J.E. (2011). **Virus del dengue: estructura y ciclo viral.** Infection, 15(1), 33-43. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100006&lng=en&tIng=es.
- Vertyporokh, L., Kordaczuk, J., Mak, P., Hulas-Stasiak, M. & Wojda, I. (2019). **Host-pathogen interactions upon the first and subsequent infection of *Galleria mellonella* with *Candida albicans*.** Journal of insect physiology, 117:103903. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2019.103903.
- Vinodkumar, C.S., Kalapannavar, N.K., Basavarajappa, K.G., Sanjay, D., Gowli, C., Nadig, N.G. & Prasad, B.S. (2013). **Episode of coexisting infections with multiple dengue virus serotypes in central Karnataka, India.** Journal of infection and public health, 6(4):302-6. DOI: 10.1016/j.jiph.2013.01.004.
- Vivier, E. & Malissen, B. (2005). **Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited.** Nature immunology, Jan;6(1):17-21. DOI: 10.1038/ni1153.
- Wash, R. & Soria, C.D. (2015). **True Blood: dengue virus evolution.** Nature reviews. Microbiology, 13 (11): 662. DOI: 10.1038/nrmicro3570
- Weaver, S.C. & Vasilakis, N. (2009). **Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease.** Infection, genetics and evolution, 9(4):523-40. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.02.003.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. & Bartenschlager, R. (2009). **Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites.** Cell host & microbe. 5 (4): 365-375. DOI: 10.1016/j.chom.2009.03.007.
- Whitehead, S.S., Blaney, J.E., Durbin, A.P. & Murphy, B.R. **Prospects for a dengue virus vaccine.** Nature reviews. Microbiology, 5(7):518-28. DOI: 10.1038/nrmicro1690.
- World Health Organization. (2019). **Dengue control. What is Dengue?** Recuperado de <https://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>
- Wu, G., Yi, Y., Lv, Y., Li, M., Wang, J. & Qiu, L. (2015). **The lipopolysaccharide (LPS) of *Photorhabdus luminescens* TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in *Galleria mellonella* larvae.** Journal of invertebrate pathology, 127:63-72. DOI: 10.1016/j.jip.2015.03.007.

- Wu, G., Xu, L. & Yi, Y. (2016). ***Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immune responses.** Immunology letters, 174:45-52. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.04.013.
- Xi, Z., Ramirez, J.L. & Dimopoulos, G. (2008). **The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection.** PLoS pathogens, 4;4(7):e1000098. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000098.
- Xie, X., Zou, J., Puttikhunt, C., Yuan, Z. & Shi, P.Y. (2015). **Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly.** Journal of virology, 15;89(2): 1298-1313. DOI: 10.1128/JVI.02882-14.
- Yan, J., Zhao, N., Yang, Z., Li, Y., Bai, H., Zou, W., Zhang, K. & Huang, X. **A trade-off switch of two immunological memories in *Caenorhabditis elegans* reinfected by bacterial pathogens.** The Journal of biological chemistry, 11;295(50):17323-17336. DOI: 10.1074/jbc.RA120.013923.
- Yi, Y., Xu, H., Li, M. & Wu, G. (2019). **RNA-seq profiles of putative genes involved in specific immune priming in *Bombyx mori* haemocytes.** Infection, genetics and evolution, 74:103921. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103921.
- Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G. & Chen, J. (2008). **Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation.** Science, 319 (5871): 1834-1837. DOI: 10.1126/science.1153264.
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J. & Rossmann, M.G. (2003). **Structures of immature flavivirus particles.** The EMBO journal, 22 (11): 2604- 2613. DOI: 10.1093/emboj/cdg270
- Zhang, S.M., Adema, C.M., Kepler, T.B. & Loker, E.S. (2004). **Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate.** Science, 305 (5681), 251–254. DOI: 10.1126 / science.1088069
- Zhang, R., Zhu, Y., Pang, X., Xiao, X., Zhang, R. & Cheng, G. (2017). **Regulation of Antimicrobial Peptides in *Aedes aegypti* Aag2 Cells.** Frontiers in cellular and infection microbiology, 3;7:22. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00022.
- Zhou, G., Kohlhepp, P., Geiser, D., del Carmen Frasquillo, M., Vazquez-Moreno, L. & Winzerling, J.J. (2007). **Fate of blood meal iron in mosquitoes.** Journal of insect physiology, 53(11):1169-78. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2007.06.009.

APÉNDICE

1. Solución azucarada.

- Azúcar 50 g
- Agua Aforar a 500 ml

2. Solución miel-colorante.

- Miel 100 g
- Colorante vegetal 4 ml
- Agua Aforar a 500 ml

3. Alimento para larva.

- Molido para larvas 25 g
- Agua Aforar a 200 ml

4. Molido para larva.

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

ESQUEMA DE ALIMENTACION PARA LARVAS DE MOSQUITOS *Aedes aegypti* CONTENIDAS EN UNA TINA CON 2 LITROS DE AGUA

DÍA DE DESARROLLO DE LA LARVA	CANTIDAD DE ALIMENTO EN MICROLITROS (μ L)
1	500
2	0
3	1000
4	1500
5	2000
6	2000
7	1500
8, 9...	En función de las larvas restantes



Centro de
Investigación en
Dinámica Celular



Instituto Nacional
de Salud Pública



**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Especificidad del priming inmunológico en el mosquito *Aedes aegypti* durante un reto heterólogo con los serotipos 2 y 4 del virus del dengue**, que presenta el alumno **Juan Manuel Hernández Tablas (10024368)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Otoniel Rodríguez Jorge CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Jorge Armando Cime Castillo Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)	APROBADO	
Dr. Agustín Reyes Pérez CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)	APROBADO	

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 MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2022-11-16 14:52:58 | Firmante

XPq2sUPFOO9ualpqYT6bKyodFCJty81FLQm5+omcuzW11KrWSBNDTDJ+k0LMOPrOPN1SQdrl/5Xz2xbzbPECoHsgH0zdHLf9FFFfx1Clyg0QGvWkzyaeOOYu74eKLEo5vcvM7bAtpa2/YmmSsg8zI6mO6PsAgzRmgVfQwUftjFD9gnhaWMqt3uTonHXu/hWryjOQj2DxQ1FNaXEKB7aoE6pke2n4GhMDRxxKNynOAJe/sNbY3EFF1qmTyPV1yzW5ewvBa7KibqhzKpokXHSAP5SooeRAPbksZH2Omfq9+2xnBY9l0z6ZA1/Bi5bltYOT2SI7oAyWnkK+CgEEBERXw==

OTONIEL RODRIGUEZ JORGE | Fecha:2022-11-16 17:02:50 | Firmante

fdDSyfk++2r2we9BcN+3V+61ZiFCAZaVNoP4Zi2H2RMScO/zgQJNIC4riMTpn+eqVqUTX407fbYShijour2yKur5al3IsfA77AjpRuHKnj7A+F2SUS799IYFszACrEcbJ1oegqNQE84ecKyjwQxFilv9SovRkHqRdgmXyP+QqDbsEyAV4G+xlSAfbZB5DP05ylemi/8dQVKiXbg7VG+xlJ6FRzYd+tpWC1bNfcEvQ8Sk7h8hubnwx6mmOCUAlmjMLmRrLufQld4fvdFBmLxubrHEwfsdRps5SQSjdP6GRG7W7hP8mwP3i+bBMY1cSbbDnmpy6xVzT4fAL6ycm4/A==

AGUSTIN REYES PEREZ | Fecha:2022-11-16 22:49:01 | Firmante

hpOucBkPfy+hmLKFk5vg5Rr7PSgPRtHQHcy/jlW46n3bUTdojLKWIXhTHbiYXFNR9F9Cd2UwL14qjqdfcxTn4RHQoAKi+3QdUyKjxmGLSv7HiunIPvn+7paKL5baY47ZrNc7mMDApENG+zxnq5r7a+lu9pCeN8a5jC3jAu3tJfB9eWY+FIUhlE1bScpdHQHHACTe03E8h+RD1KqcE/t9XWocPFwcNiGgYhbNhg/ZbZiWWDzShpyu1wXX6sLKKpQqzK2n3krznGxAxpUYHxvi6OdbZNdJtQHqVpC9XLZa1YXpZncb7RNybAwbMu95lBx0gz+r5JcVWaacN3ajYVw==

CUAUHTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA | Fecha:2022-11-17 10:51:18 | Firmante

J9AXfi2qsVAkJ6VunEtEovJ54RDbFlzkG598rL1aYSoxQ9W/qjmd8qE+rY7wnDVPCsyEDC8MgZ12BlJki4nXEa9wxuMFtn2cw0JBnaHr/slCn+W+IQQ+X+ELNbp1WkEDowo2cQ4roLepxxKy6jJPBw3DWcywltXf+cs59zUbODSGN8tvO5qE9sDqu8QHP+dmHSnJNOExB0iu+nc70Ut48N+vN+9tldY3TwpH968vrOlJa4oNezgt8a2UpUv8OmpiiKgxXNJoVVzX2YS2rR/roj8Km7Afkquw9ponT6OCww8TBGVz8SBYGFwicqLChpJEQRusYEHiikvIHVcSg==

JORGE ARMANDO CIME CASTILLO | Fecha:2022-11-17 11:01:04 | Firmante

XtcNAEP9h/Odpns961xg2/YziYrx5sQQXvVNM8euudXaRJMcyNk8ba4pjZcnxLkzGPLM4XAVn3u9/tldet6qIgsVt6T7mUwdnQj+JNDorNvPaAvsuYmxfybz1zUbr8QaotUAC7PV9ueFavXFJjba9xyB+pZG0ln6O4YO1IFb8EYJlxtvD8G91hAt0DpT7DJsA3r+SLHD7CsrXSUJSD4IBQJE/2pwxzA5WqzUKn6nciggulAFXUggmSglGcmhaioYoSqt6GLUUm9qk3afo09nisLCD9YZ6bZQFIoNAMfBZsnk2RNBKjDndm6tkd/B0miH6TTWtkO2tOKciKEQ==

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



FTwEBeZnZ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ApkfXvWreQ5XyInwr1zHktGMaKyPLeK>