



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Instituto Pasteur de Guadalupe

**Transmisión de arbovirus en poblaciones de
Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) de La
Habana, Cuba**

Autora: Gladys Gutiérrez Bugallo

Tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias de la Salud

Tutoras: Dr.C. Anubis Vega Rúa

Dr.Cs. María G. Guzmán Tirado

**A la memoria del científico cubano Carlos
Juan Finaly Barrés (1833-1915)**

*"His reasoning for selecting
the Stegomyia [mosquito] as the bearer of
yellow fever is the best piece of logical
reasoning that can be found in medicine
anywhere."*

William Crawford Gorgas

**A mi hijo Hugo, para que en la
perseverancia encuentre a su mejor aliada.**

*"(...) Siempre vale la agonía de la prisa
aunque se llene de sillas la verdad."*

Silvio Rodríguez Domínguez



AGRADECIMIENTOS

Convencida de que “se alcanza el éxito convirtiendo cada paso en una meta y cada meta en un paso”, ha llegado el momento de presentar esta tesis, sabiendo que todavía constituye un paso en la eterna marcha de la investigación científica. Y es que en cada paso de esta meta (=paso), hubo personas imprescindibles (y numerosas) que me permitieron alcanzar este éxito efímero.

La primera mención es para mi esposo, mi compañero en todos los aspectos de la vida: espiritual, ideológico, profesional; que ha batallado con mis ausencias prolongadas, y mi inmersión en la investigación, siempre con amor, comprensión y apoyo. Él ha sido una persona indispensable en el desarrollo de este proyecto, tanto en la retaguardia (cumpliendo roles de madre y padre) como en el frente de batalla, poniendo y recogiendo ovitrampas. Junto a él y gracias a él, he podido defender mi doctorado hoy, a la vez que disfrutar de mi maternidad y a mi Hugo, inspiración de mi vida y mi razón de ser, a quien también agradezco su aliento y su comprensión.

A la par, quiero agradecer a mi familia, empezando por mis padres, dos seres que han sido determinantes en mi vida, tanto desde el punto de vista espiritual como intelectual. A todo el tiempo que me han dedicado y dedican todavía, a sus atenciones, preocupaciones, ocupaciones, desvelos, intenciones, sus valores, su amor y su ejemplo les debo lo que soy. Otros miembros de la retaguardia afectiva y logística fueron mis suegros, siempre preocupados por el avance de la tesis. Quiero dar gracias también a mi hermana, Faby (el sobrino más “tranquilito del mundo”), mi tío Jorge (pendiente todo el tiempo de mis resultados profesionales), mi tía Amarilys (lejos pero presente) Carlitín, Ibet y mis primos Jorgito, Yailín y Daniela; Irvings, Jannis y Maye. Aunque presentes no más que en mi memoria, recuerdo agradecida a mis abuelos Magaly, Rigo y Virgilio.

En esta lista multitudinaria no pueden faltar mis colegas y amig@s del Departamento Control de Vectores, así como mis estudiantes Flavia y Dámaso, que acompañaron y fueron parte de estos resultados. Un agradecimiento heroico merece el equipo de colecta, empezando por Yanet, mi fiel amiga, Jorge Anaya, Eric y los que se sumaban

Mandy, Yani, Jorge Sánchez, Gato (con su apoyo logístico y profesional) y toda la tropa de Diez de Octubre (María del Carmen, Marisol, Eduardo) y Párraga. Mi gratitud alcanza también a un grupo de colegas con muchísima experiencia y gran corazón que desinteresadamente revisaron el documento, aportaron ideas, aclararon dudas, hicieron mapas y figuras, correcciones e imprescindibles contribuciones. Ellos son Hildita, María del Carmen Marquetti, Waldemar, Ñikie, Annia, Maureen, Ariamys, Jorge Sánchez (Jorgito), María Eugenia Toledo, Belkis Galindo, Gato, Mayling y Ana Beatriz. Otros como, mi amiga Yisel, Yosiel, Zulema, Aileen, Domingo, Yanisley, Mónica, Israelito, Ilario, Nell, Claudia, el equipo de la TIE; me permitieron presentarles una y otra vez los resultados de esta tesis y siempre sus comentarios e ideas fueron muy útiles. A las colegas de Virología quiero agradecer su apoyo y alegría constantes, en especial a mi tutora, la Dra Lupe, cuyo ejemplo y consagración me han servido de guía. Otros amigos en los que siempre encontré apoyo fueron mis “camaradas del Partido” Ana Lourdes, Alina Martínez, Pedro Casanova y Pele; así como el equipo del Consejo de Dirección del IPK, que me animó siempre a llegar hasta aquí. Las gracias también van para las chicas de Docencia, encabezadas por Martica, que con gran optimismo adaptaron las reglas para que este “doctorado inusual” llegara a feliz término. No pueden faltar aquí los miembros de mi tribunal de pre-defensa: Drs Yudira Soto, Lissette Pérez, Daniel González y Félix Dickinson, así como las ya mencionadas Mayling y María del Carmen, por sus certeras y valiosas sugerencias. Entre los que ya no están en el IPK, pero fueron fundamentales en esta investigación, están mi querida Rosmari y Gisell, a ellas mi profundo agradecimiento. Otro agradecimiento merecen la desaparecida DrC Magdalena y el DrC Bisset, quienes me permitieron llegar hasta aquí. Aunque no ligada directamente a los mosquitos ni los virus, agradezco a mi amiga Rucu y a los malnombristas.

Y la mutinacionalidad de esta investigación me permitió conocer a gente de muchas partes del mundo y de diferentes instituciones, que abonaron esta tesis con pensamientos muy originales y estuvieron pendiente de sus resultados. Una mención especial merecen los colegas/amig@s de VectoCaribe: Danya, Carles, David, Manuel de Martinica, Luisito, y Wilfre, así como la DrC Vivian Huerta por acceder a realizar la

oponencia de mi pre-defensa. Asimismo, incluyo a George, Victor, Krystal, Chinmay, Johnny, Vandana, Yuemey, Shengzhang y el resto del GDL de la Bloomberg.

Y aunque pareciera que han quedado olvidados para el final, no es así. He dejado para lo último a mi familia de Guadalupe y el Pasteur porque tengo mucho que agradecer. La primera es mi tutora, amiga y excelente científica: Anubis Vega Rua, quien desde el primer momento confió en mí y me animó siempre a seguir y aspirar a más. Las apasionantes discusiones y proyectos, sus ideas claras y atinadas, su buen corazón, su hospitalidad y la de toda su familia (Adrien, Mamita, Aramís, Chantal y el pequeño Aslan), han sido los tesoros más valiosos en este bregar. Los agradecimientos para al equipo de LECOV, ahora LMV, y todo el Pasteur debería escribirlos en francés, pero los dejo en español para que las chicas se practiquen ☺. Un abrazo agradecido va para *mes chéries* Elodie (mon amie), Christelle (alias Cristobalina, ma belle sœur), Margot (ma chérie préféré), Yolène (Yoyo), así como los antiguos miembros del lab, que aportaron tanto a esta tesis: Lyza y Antoine Boullis: cuando digo que son mi familia, no exagero. Con cariño agradezco también a Matthieu, Margaux, Andric, Celia, Steph y su familia, Yann, M. Talarmin, Isabel, Severine, Mariette, David. las chicas de la Accueil y todo el equipo del IPG. A mi amigo Dévys le debo un agradecimiento especial por estar siempre dispuesto a ayudar. Agradezco enormemente a Mme Remus, de la Université des Antilles, y la DrC Silvina González-Rizzo por su apoyo incondicional, así como a todo el colectivo de los laboratorios de entomología de la red Pasteur, liderados por Anna-Bella Failloux, quienes han contribuido y les han dado seguimiento a estos resultados. Amigos que conocí en este ir y venir al IPG han quedado para siempre en mi corazón como Kathy, Fabrice, Luci y Ernesto (mis anfitriones parisinos), Ulises, Kenia, Yancy y la tropa cubana en Guadalupe, a ellos, también muchas gracias. Nunca olvidaré tampoco el apoyo e impulso que significó para esta tesis y mi crecimiento profesional el programa *Jeunes Talents France L'Oréal-UNESCO Pour les Femmes et la Science*.

Y si por la premura y el corre-corre de la tesis, alguien se hubiera quedado fuera, sepa que en mi corazón y mi memoria, aparecerá con todo mi agradecimiento y remordimiento por el olvido.

TABLA DE CONTENIDO

SÍNTESIS.....	V
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
NOVEDAD CIENTÍFICA.....	4
VALOR TEÓRICO	5
VALOR PRÁCTICO	5
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1.1 LOS ARBOVIRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA Y ZIKA.....	6
1.1.1 <i>Clasificación, estructura, organización genómica y ciclo replicativo de los virus del dengue, chikungunya y Zika</i>	7
1.1.1.1 Los flavivirus dengue y Zika.....	7
1.1.1.2 El alfavirus chikungunya.....	9
1.1.2 <i>Origen, distribución geográfica y epidemiología de los virus del dengue, chikungunya y Zika..</i>	11
1.1.2.1 Virus del dengue.....	11
1.1.2.2 Virus Chikungunya.....	13
1.1.2.3 Virus Zika	14
1.1.3 <i>Enfermedad por dengue, chikungunya y Zika.....</i>	16
1.1.3.1 Enfermedad por los virus del dengue.....	16
1.1.3.2 Enfermedad por el virus chikungunya.....	17
1.1.3.3 Enfermedad por el virus Zika.....	18
1.1.4 <i>Incidencia de los virus del dengue, chikungunya y Zika en Cuba</i>	18
1.1.4.1 La incidencia de los virus del dengue en Cuba	18
1.1.4.2 La incidencia del virus chikungunya en Cuba	19
1.1.4.3 La incidencia del virus Zika en Cuba	19
1.2 TRANSMISIÓN DE ARBOVIRUS POR <i>Aedes aegypti</i>	20
1.2.1 <i>El mosquito Aedes aegypti.....</i>	20
1.2.1.1 Origen y distribución de <i>Aedes aegypti</i>	20
1.2.1.2 Ciclo de vida y bioecología de <i>Aedes aegypti</i>	21
1.2.1.3 <i>Aedes aegypti</i> como vector	23
1.2.1.3.1 Las barreras internas de <i>Aedes aegypti</i> a la infección por arbovirus	24
1.2.2 <i>Transmisión de arbovirus en la naturaleza.....</i>	27
1.2.2.1 Ciclos de transmisión selvática de arbovirus.....	27
1.2.2.2 Ciclos de transmisión urbana de arbovirus	28
1.2.2.3 Transmisión horizontal de arbovirus	29
1.2.2.4 Transmisión inter-vectorial de arbovirus	29
1.2.2.4.1 Transmisión vertical de arbovirus	30
1.2.2.4.2 Transmisión venérea de arbovirus	31
1.2.2.5 Transmisión no vectorial de arbovirus	32
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1 TIPO DE ESTUDIO	33
2.2 DECLARACIONES ÉTICAS.....	33

2.3	ESTUDIOS EN CONDICIONES NATURALES, LA HABANA, CUBA.....	33
2.3.1	<i>Diseño temporal del estudio</i>	33
2.3.2	<i>Descripción de las áreas de estudio</i>	34
2.3.3	<i>Colecta de mosquitos y preparación de las muestras entomológicas</i>	35
2.3.4	<i>Estimación de la abundancia relativa de Aedes aegypti en las áreas Pasteur y Párraga en el periodo 2018-2019</i>	37
2.3.5	<i>Distribución espacio-temporal de los virus del dengue y Zika</i>	37
2.3.5.1	Extracción de ARN viral de los grupos de <i>Aedes aegypti</i>	37
2.3.5.2	Detección y secuenciación de los virus del dengue en grupos de <i>Aedes aegypti</i>	38
2.3.5.2.1	Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa	38
2.3.5.2.2	Segunda reacción de la PCR anidada: serotipificación de los virus del dengue.....	39
2.3.5.2.3	Electroforesis en gel de agarosa	39
2.3.5.2.4	Secuenciación nucleotídica de los amplicones obtenidos del gen <i>c-prm</i> de los virus del dengue	40
2.3.5.3	Detección y secuenciación del virus Zika en grupos de <i>Aedes aegypti</i>	42
2.3.5.3.1	PCR en tiempo real: detección del genoma viral de Zika.....	42
2.3.5.3.2	Secuenciación nucleotídica del virus Zika.....	42
2.3.5.4	Cálculo de la proporción de los virus del dengue y Zika	44
2.3.5.5	Cálculo de la frecuencia de aparición de los virus del dengue y Zika	44
2.3.5.6	Cálculo de las tasas de infección mínima de los virus del dengue y Zika.....	44
2.3.5.7	Construcción de mapas de distribución espacio-temporal de los virus del dengue y Zika.....	44
2.4	ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN DE ARBOVIRUS EN CONDICIONES DE LABORATORIO	45
2.4.1	<i>Poblaciones de Aedes aegypti estudiadas</i>	45
2.4.2	<i>Cultivos celulares</i>	46
2.4.3	<i>Cepas de los virus dengue-1, chikungunya y Zika ensayadas</i>	47
2.4.3.1	Generación de los lotes virales de dengue-1.....	47
2.4.3.2	Generación de los lotes virales de chikungunya y Zika.....	47
2.4.3.3	Titulación del lote viral de dengue-1 utilizando el método de inmuno-fluorescencia indirecta	48
2.4.3.4	Titulación de los lotes virales de chikungunya y Zika utilizando el método TCID ₅₀	48
2.4.4	<i>Ensayos de competencia vectorial</i>	49
2.4.4.1	Titulación mediante ensayos de inmuno-fluorescencia en células C6/36 de muestras de tórax-abdomen, cabezas y salivas	50
2.4.4.2	Titulación por determinación de efecto citopático en células Vero.....	50
2.4.4.2.1	Titulación de muestras de tórax-abdomen y cabezas	50
2.4.4.2.2	Titulación de muestras de saliva	51
2.4.4.3	Estimación de los parámetros de competencia vectorial.....	51
2.4.5	<i>Ensayos de transmisión vertical</i>	51
2.4.5.1	Amplificación viral en cultivos celulares.....	53
2.4.5.2	Extracción de ARN de sobrenadantes celulares	54
2.4.5.3	Detección de genoma viral en muestras de los ensayos de transmisión vertical.....	54
2.4.5.4	Secuenciación nucleotídica de las muestras positivas de los ensayos de transmisión vertical	55
2.4.5.5	Estimación de los parámetros de transmisión vertical.....	56
2.4.6	<i>Análisis estadísticos</i>	57
2.5	CONSTRUCCIÓN DE FILOGENIAS.....	58
III.	RESULTADOS	59
3.1	TRANSMISIÓN VERTICAL DE LOS VIRUS DEL DENGUE Y ZIKA EN EL CONTEXTO CUBANO	59
3.1.1	<i>Primer estudio: periodo septiembre 2013 - julio 2014</i>	59
3.1.1.1	Distribución espacio-temporal de los virus del dengue	59
3.1.1.2	Genotipificación de los virus del dengue.....	60
3.1.2	<i>Segundo estudio: periodo mayo 2018 – marzo 2019</i>	61
3.1.2.1	Distribución espacio-temporal de los virus del dengue en las áreas de estudio	62
3.1.2.2	Distribución espacio-temporal del virus Zika en las áreas de estudio.....	63

3.1.2.2.1	Genotipificación del virus Zika.....	64
3.2	COMPETENCIA VECTORIAL DE POBLACIONES DE <i>Aedes aegypti</i> DE LA HABANA A ARBOVIRUS.....	64
3.2.1	<i>Competencia vectorial de las poblaciones PTE y PRG a los flavivirus dengue-1 y Zika.....</i>	64
3.2.2	<i>Competencia vectorial de las poblaciones PTE y PRG al alfavirus chikungunya.....</i>	65
3.3	TRANSMISIÓN VERTICAL DE ARBOVIRUS EN POBLACIONES DE <i>Aedes aegypti</i> DE LA HABANA, EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	66
3.3.1	<i>Tasas de transmisión vertical e infección filial mínima de los virus dengue-1, chikungunya y Zika en las poblaciones PTE y PRG.....</i>	66
3.3.2	<i>Estimación del aporte de la transmisión vertical a la transmisión horizontal</i>	67
IV.	DISCUSIÓN.....	70
4.1	TRANSMISIÓN VERTICAL DE LOS VIRUS DEL DENGUE Y ZIKA EN EL CONTEXTO CUBANO	70
4.2	COMPETENCIA VECTORIAL DE POBLACIONES DE <i>Aedes aegypti</i> DE LA HABANA A ARBOVIRUS.....	78
4.3	TRANSMISIÓN VERTICAL E INFECCIÓN FILIAL POR LOS VIRUS DENGUE-1, CHIKUNGUNYA Y ZIKA EN LAS POBLACIONES PTE Y PRG.....	84
4.4	FACTIBILIDAD DEL MONITOREO DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL DE ARBOVIRUS EN POBLACIONES CUBANAS DE <i>Aedes aegypti</i>	90
4.5	ESTIMACIÓN DEL APOORTE DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL A LA TRANSMISIÓN HORIZONTAL	92
	CONCLUSIONES	99
	RECOMENDACIONES	100
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	ANEXOS	160
	AVALES DE LA TESIS.....	171

SÍNTESIS

La transmisión vectorial de arbovirus (dengue, chikungunya y Zika) por *Aedes aegypti* es un fenómeno clave para comprender la epidemiología de estas enfermedades, sin embargo, es una temática insuficientemente estudiada. El objetivo general de esta tesis fue caracterizar la transmisión vertical y horizontal de los virus del dengue, chikungunya y Zika en poblaciones de *Ae. aegypti* de localidades de La Habana en condiciones naturales y de laboratorio. Para dar cumplimiento a este objetivo, se determinó la dinámica espacio-temporal de la transmisión vertical de los virus del dengue y Zika en poblaciones habaneras de *Ae. aegypti*, en condiciones naturales. Mediante técnicas moleculares (PCR y secuenciación nucleotídica) se examinaron estadios inmaduros de varios territorios de La Habana, comprobando la presencia de los cuatro serotipos de dengue y el virus Zika. Estos hallazgos demostraron por primera vez la ocurrencia de transmisión vertical natural de estos flavivirus en poblaciones cubanas del vector. Las relativamente altas frecuencia de aparición y tasas de infección por los virus del dengue en algunas de las áreas estudiadas sugirieron una circulación sostenida de estos virus en las poblaciones de *Ae. aegypti*. Además, se desarrollaron estudios de laboratorio para evaluar la habilidad de poblaciones locales para transmitir horizontal y verticalmente de los virus dengue-1, chikungunya y Zika. Los ensayos de competencia vectorial mostraron tasas de infección, diseminación y transmisión de los virus dengue-1 y Zika moderadas (<25%) y similares entre las poblaciones evaluadas, lo que ratificó la implicación de esta especie en la transmisión de estos durante los brotes/epidemias ocurridos en La Habana. Adicionalmente, se comprobó la habilidad de este vector para transmitir el virus chikungunya desde los tres días post exposición, lo cual constituyó una alerta sobre el riesgo latente de brotes de este arbovirus en Cuba. Los ensayos de transmisión vertical desarrollados con las mismas poblaciones de mosquito, demostraron la habilidad similar de ambas para transmitir verticalmente los tres virus durante el primer y segundo ciclos gonadotróficos, ratificando los resultados encontrados en el terreno. Por último, se comprobó que hembras de *Ae. aegypti* infectadas verticalmente excretaron partículas virales infecciosas de chikungunya y Zika en la saliva, lo cual demuestra la capacidad de esta vía de transmisión para generar

vectores con potencialidad para infectar hospederos vertebrados. También se detectó la presencia del virus dengue-1 en cabezas de hembras infectadas verticalmente, lo que alerta sobre la posible ocurrencia de este mecanismo también con este flavivirus. El conjunto de resultados obtenidos señala a la transmisión vertical en *Ae. aegypti* como un modo de transmisión de arbovirus epidemiológicamente relevante que amerita continuar siendo estudiado y a la vez, refuerza la importancia del control de las poblaciones pre-adultas del vector y del monitoreo entomo-virológico de las mismas como una herramienta promisorio para la prevención y la vigilancia de la circulación de arbovirus en Cuba.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, transmisión vertical, transmisión horizontal, arbovirus, vigilancia entomo-virológica, competencia vectorial, mosquitos.

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNi	ARN de interferencia
ARNsi	ARN de interferencia pequeño
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (de sus siglas en inglés)
ATP	Trifosfato de adenosina (de sus siglas en inglés)
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (de sus siglas en inglés)
C	Cápside
CaV	Capacidad vectorial
CG	Ciclo gonadotrófico
CoV	Competencia vectorial
Ct	Ciclo umbral (de sus siglas en inglés)
DE	Desviación estándar
DMEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco (de sus siglas en inglés), también conocido como Medio Esencial Mínimo.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato (de sus siglas en inglés)
dpe	Días post exposición
E	Envoltura
ECP	Efecto citopático
ECSA	Este, Centro y Suraficano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GS	Glándulas salivares
GTR+ γ+ I	Modelo de sustitución nucleotídica (del inglés <i>General Time Reversible</i>) con la distribución y de variación entre sitios y la proporción de sitios invariantes
IC	Índice Casa
IDH	Índice de densidad de huevos
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia (de sus siglas en inglés)
IgG	Inmunoglobulina G
IOL	Linaje del Océano Indico (de sus siglas en inglés)
IOP	Índice de ovitrampa positiva
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
L-15	Medio de cultivo celular Leibovitz L-15

Listado de abreviaturas

LB	Lámina basal
MEB	Barrera al Escape del Intestino Medio (de sus siglas en inglés)
MIB	Barrera a la Infección del Intestino Medio (de sus siglas en inglés)
MOI	Multiplicidad de infección (de sus siglas en inglés)
MP	Membrana peritrófica
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NS1-5	No estructural (de sus siglas en inglés)
nsP	Proteína no estructural (de sus siglas en inglés)
nt	Nucleótido
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura (de sus siglas en inglés)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (de sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés)
PIE	Periodo de incubación extrínseco
PNHs	Primates no humanos
PRG	Población de mosquito colectada en el área de salud Párraga
PrM	Pre-membrana
PTE	Población de mosquito colectada en el área de salud Pasteur
R ₀	Número reproductivo básico
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN (de sus siglas en inglés)
P1234	Poliproteína no estructural
RE	Retículo endoplasmático
RT	Transcripción reversa (de sus siglas en inglés)
RTPasa	ARN trifosfatasa
RT-qPCR	Reverso transcripción seguida de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (de sus siglas en inglés)
SEB	Barrera al Escape de las Glándulas Salivales (de sus siglas en inglés)
SFB	Suero fetal bovino
sfrNA	ARN subgenómico
SGB	Síndrome Guillain-Barré
SIB	Barrera a la Infección de las Glándulas Salivales (de sus siglas en inglés)
SZC	Síndrome de Zika congénito
Tamura-Nei+G	Modelo de sustitución nucleotídica Tamura-Nei con la distribución y de variación entre sitios
TBE	Tampón formado por Tris, borato y EDTA
TCID ₅₀	Dosis media infecciosa en cultivo de tejidos
TD	Tasa de diseminación
TH	Transmisión horizontal
TI	Tasa de infección

Listado de abreviaturas

TIF	Tasa de infección filial
TIF-C	Tasa de diseminación filial
TIFM	Tasa de infección filial mínima
TIFM-M	Tasa de infección filial mínima en machos
TIF-S	Tasa de infectividad filial
TIM	Tasa de infección mínima
TIVe	Tasa de infección vertical efectiva
TIVe-C	Tasa de infección vertical efectiva hasta cabeza
TIVe-S	Tasa de infección vertical efectiva hasta saliva
TOT	Transmisión transovárica
TT	Tasa de transmisión
TTV	Tasa de transmisión vertical
TTV-C	Tasa de transmisión vertical hasta cabeza
TTV-M	Tasa de transmisión vertical hacia machos
TTV-S	Tasa de transmisión vertical hasta saliva
TV	Transmisión vertical
TVN	Transmisión venérea
uff	Unidades formadoras de foco
ufp	Unidades formadoras de placa
UTR	Región no traducible (de sus siglas en inglés)
UVE	Unidad de Virus Emergentes
VCHIK	Virus chikungunya
VDEN	Virus del dengue
VFA	Virus de la fiebre amarilla
VLAC	Virus La Crosse
VMAY	Virus Mayaro
VNO	Virus del Nilo occidental
VONN	Virus O'nyong-nyong
VZIK	Virus Zika

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.1 Estructura viral y organización genómica de los flavivirus y del alfavirus chikungunya	8
Tabla 1.1 Genotipos que componen cada uno de los cuatro VDENS y su distribución geográfica mundial	14
Figura 1.2 Estadios del ciclo de vida y fases de la infección de los arbovirus en <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 1.3 Modos de transmisión de arbovirus en <i>Aedes aegypti</i> . Distribución de los registros globales de transmisión vertical de los virus del dengue, chikungunya y Zika en poblaciones naturales de <i>Aedes aegypti</i>	30
Figura 2.1 Esquema del diseño general del estudio de la transmisión de arbovirus por poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> de La Habana.....	34
Figura 2.2 Mapa de la provincia La Habana con la ubicación del municipio Arroyo Naranjo y Diez de Octubre.....	35
Tabla 2.1 Características de las cepas virales de dengue-1, chikungunya y Zika empleadas en los ensayos experimentales de competencia vectorial y transmisión vertical de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> PTE y PRG.....	49
Figura 2.3 Flujo de trabajo para los ensayos de transmisión vertical desarrollados con las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> PTE y PRG frente a los virus dengue-1, chikungunya y Zika	53
Figura 2.4 Representación esquemática de los parámetros de transmisión vertical calculados en los ensayos realizados con las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> (PTE y PRG) frente a los virus dengue-1, chikungunya y Zika	57
Tabla 3.1 Cantidad de ejemplares de <i>Aedes aegypti</i> recibidos (N), grupos formados (G), cantidad media de individuos por grupo (X), grupos positivos a algún serotipo de dengue (P) y tasa mínima de infección por los virus del dengue (TIM) por área de salud y meses de estudio	60
Figura 3.1 Distribución espacio-temporal de los virus del dengue encontrados en los grupos de estadios inmaduros de <i>Aedes aegypti</i> en Arroyo Naranjo entre septiembre/2013 – julio/2014	60

Figura 3.2 Árbol filogenético de VDEN-1	62
Figura 3.3 Árbol filogenético de VDEN-3	62
Figura 3.4 Árbol filogenético de VDEN-4.....	62
Tabla 3.2 Cantidad de ejemplares de <i>Aedes aegypti</i> examinados (N), grupos formados (G), cantidad media de individuos por grupo (X), grupos positivos a los virus del dengue y Zika (P) y tasa de infección mínima (TIM) en las áreas de salud Pasteur (PTE) y Párraga (PRG) por meses de estudio.....	63
Figura 3.5 Distribución espacio-temporal de los grupos de <i>Aedes aegypti</i> positivos a los virus del dengue y Zika en las áreas de salud Pasteur (PTE) y Párraga (PRG), durante los meses mayo/2018-marzo/2019.....	64
Figura 3.6 Árbol filogenético de VZIK	65
Figura 3.7 Tasas de infección (A), diseminación (B) y transmisión (C) (intervalo de confianza $\pm 95\%$) de dos poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> de La Habana: PTE y PRG, a los 3, 7 y 14 días post exposición a los virus Zika, dengue-1 y chikungunya	65
Tabla 3.3 Títulos virales medios (\pm DE) estimados en la saliva de hembras de dos poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> (PTE y PRG) de La Habana, después de tres, siete y 14 días de ser expuestas a los virus Zika, dengue-1 y chikungunya.....	65
Figura 3.8 Tasas de transmisión vertical (TTV) y de infección filial mínima (TIFM) de los primer y segundo ciclos gonadotróficos (intervalo de confianza $\pm 95\%$) de dos poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> de La Habana: PTE y PRG a los virus dengue-1, Zika y chikungunya.....	67
Tabla 3.4 Datos y parámetros de transmisión vertical obtenidos del segundo ciclo gonadotrófico de hembras de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a los virus dengue-1, chikungunya y Zika.....	68
Figura 3.9 Mapa de calor con muestras positivas y negativas de la progenie del segundo ciclo gonadotrófico proveniente de madres de <i>Aedes aegypti</i> expuestas a los virus dengue-1, chikungunya y Zika.....	68

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus agrupan a una variedad de entidades virales que circulan en la naturaleza alternando entre vectores y hospederos vertebrados⁽¹⁾. Entre ellos, los virus transmitidos por *Aedes aegypti* (Linneus, 1762) (subgénero *Stegomyia*), han afectado a las poblaciones humanas por siglos⁽²⁾. En particular, los flavivirus dengue (VDEN) y Zika (VZIK), así como el alfavirus chikungunya (VCHIK) se consideran globalmente entre los de mayor relevancia epidemiológica^(3, 4), y provocan epidemias frecuentes a través de eventos de emergencia y re-emergencia⁽⁵⁾.

Los virus del dengue (VDEN-1, -2, -3 y -4) son los más extendido y causantes del mayor número de casos de arbovirosis en Las Américas, con circulación de sus cuatro serotipos. Aunque estos virus son endémicos en la mayoría de los países de Centro, Sur-América y el Caribe, los casos de dengue aumentaron en la región en las últimas cuatro décadas, de 1500 millones de casos entre 1980 y 1989 a 17 500 millones en 2010-2019⁽⁶⁻⁹⁾. La infección por VDENS es frecuentemente inaparente⁽¹⁰⁾, aunque puede producir un amplio rango de manifestaciones clínicas, que van desde un cuadro leve, hasta las formas severas que pueden conducir a la muerte^(11, 12).

Por su parte el VCHIK, emergió en Las Américas en 2013, causando tres grandes epidemias entre 2014 y 2016, con 671 628 – 1 089 982 casos notificados por año en ese periodo. Una década después, el VCHIK sigue propagándose y causando epidemias en la región. Hasta la fecha, se registran 3700 millones de casos sospechosos y confirmados de chikungunya en 50 países o territorios del continente⁽¹³⁾. La enfermedad causada por el VCHIK se caracteriza por manifestaciones agudas y crónicas, que suelen incluir fiebre y poliartralgias, a menudo dolorosas y debilitantes⁽¹⁴⁾, lo que la convierte en un importante problema de salud pública⁽¹³⁾.

El VZIK, por el contrario, tras su entrada en la región americana en 2015, causó una gran epidemia con 650 867 casos notificados en 2016, seguida de un descenso sustancial en los años siguientes⁽¹⁵⁾. Si bien el descenso de las notificaciones de casos de Zika se debe probablemente a la inmunidad colectiva y su efecto en la limitación de la transmisión⁽¹⁵⁾, el reducido número de registros de casos también puede deberse a su mayor tasa de infecciones inaparentes (~80%)⁽¹⁶⁾, junto al descenso de la

vigilancia⁽¹³⁾. Aunque la enfermedad por Zika es habitualmente leve⁽¹⁶⁾ y autolimitada, se han asociado dos síndromes a la infección por VZIK: el Síndrome Guillain Barré y el síndrome de VZIK congénito (SZC)⁽¹⁷⁾. Este último es el más alarmante y reúne un conjunto de anomalías en el recién nacido o feto de una madre infectada^(18, 19).

En Cuba la primera epidemia de dengue confirmada a nivel de laboratorio se registró en 1977, causada por el serotipo 1⁽²⁰⁾. A partir de entonces, la isla se ha visto afectada por brotes, epidemias y co-circulación de varios serotipos de dengue, lo cual ha sido más frecuente a partir del siglo XXI⁽²¹⁾. El año 2013 fue el de mayor registro de casos de dengue en Las Américas, previo a la introducción de los VCHIK y VZIK en diciembre de 2013 y 2015 respectivamente⁽²¹⁾. Cuba no estuvo ajena a esta tendencia, con brotes y co-circulación de los VDENS y VZIK registrados en todas las provincias del país entre 2017 y 2019⁽²¹⁾. Sin embargo, a pesar de identificarse alrededor de 200 casos importados de chikungunya en el territorio nacional⁽²²⁾ y la detección de la transmisión autóctona de este virus en la provincia de Santiago de Cuba durante 2015⁽²¹⁾; la transmisión local de este alfavirus no se ha registrado en La Habana⁽²¹⁾.

Aedes aegypti es el principal vector global de los VDENS, VCHIK y VZIK en el entorno urbano⁽⁵⁾. Este mosquito es originario de África y su introducción en Las Américas data del siglo XVII, logrando una amplia distribución en el continente⁽²³⁾. La preferencia de este culícido para criar en las viviendas o sus alrededores y alimentarse de humanos⁽²⁴⁾ convierte a este mosquito (de entre más de 3500 especies) en el causante de las principales epidemias urbanas por arbovirus en el mundo, especialmente en regiones tropicales y subtropicales⁽⁵⁾. Estos rasgos eto-ecológicos determinan su alta capacidad vectorial para la transmisión de patógenos⁽²⁵⁾.

La transmisión horizontal (TH) de arbovirus se reconoce como la vía más frecuente y epidemiológicamente más importante⁽¹⁾. Después que la hembra de *Ae. aegypti* pica a una persona en fase virémica, desarrolla un período de incubación viral durante el cual ocurre la replicación y diseminación del patógeno hasta que alcanza las glándulas salivares y es secretado en la saliva durante la siguiente toma de sangre sobre un nuevo hospedero⁽²⁶⁾. Esa habilidad para infectarse, diseminar y transmitir un patógeno se conoce como competencia vectorial (CoV), y es esencial en las dinámicas de transmisión⁽²⁶⁾. Actualmente el control de las enfermedades que ocasionan los

arbovirus se centra en el control de las poblaciones de su vector, por lo que entender la capacidad de las poblaciones de mosquitos locales para transmitir horizontalmente los arbovirus es crucial para evaluar el riesgo de propagación y orientar los programas de control.

Además, se ha demostrado que la hembra de *Ae. aegypti* es capaz de transmitir los VDENVs, VCHIK y VZIK a su descendencia después de infectarse (transmisión vertical) tanto en condiciones de laboratorio⁽²⁷⁻³⁰⁾ como de foma natural⁽³¹⁻³³⁾. Algunos autores afirman que es poco probable que esta vía sea importante para la persistencia de los arbovirus en la naturaleza⁽³⁴⁾. Sin embargo, las incontables publicaciones de transmisión vertical (TV) de arbovirus^(1, 28, 35-39) provenientes de regiones endémicas como la India^(31, 39), Filipinas⁽⁴⁰⁾, México⁽³²⁾, Brazil^(38, 41), entre otros, sugieren que este modo de transmisión puede favorecer el mantenimiento y co-circulación de arbovirus en estos sitios y, por tanto, impactar en la epidemiología de estas enfermedades^(39, 42). No obstante, la circulación al interior de la población de vectores no es un criterio suficiente para garantizar endemidad y re-emergencia de arbovirus^(30, 43, 44). Para ello, la transferencia intervectorial del patógeno debiera asegurar que hembras infectadas verticalmente puedan infectar a un nuevo hospedero humano a través de su picada. A pesar de varios intentos para demostrar el potencial de la TV para desencadenar TH^(43, 45-47), ningún estudio publicado ha demostrado verdaderamente que hembras de *Ae. aegypti* no colonizadas y verticalmente infectados pueden excretar partículas virales infecciosas en su saliva.

También se ha verificado la factibilidad del monitoreo de la infección por arbovirus en poblaciones de mosquitos colectados en el terreno para la vigilancia de la circulación de estos virus en un área determinada, lo cual ha sido propuesto, además, como una herramienta útil en los sistema de alerta temprana de brotes^(48, 49).

En Cuba, *Ae. aegypti* se incrimina como el vector de los VDENVs, VCHIK y VZIK, básicamente a partir de datos bio-ecológicos de su elevada abundancia y amplia distribución⁽⁵⁰⁾; y los registros sobre su papel vector en varias regiones del mundo⁽⁵¹⁾. Además se demostró la ocurrencia de TV de VDEN-3 en una población habanera de este vector⁽⁵²⁾. Sin embargo, la dinámica de infección por arbovirus en las poblaciones cubanas de *Ae. aegypti* no ha sido estudiada, y se desconoce la habilidad de las

poblaciones de esta especie en Cuba para transmitir horizontal y verticalmente en el terreno y el laboratorio los VDENs, VCHIK y VZIK; así como las potencialidades de la TV para “producir” hembras infectadas capaces de transmitir horizontalmente los virus.

De ahí que la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis: Las hembras de poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana transmiten horizontal y verticalmente los virus del dengue, chikungunya y Zika; y la transmisión vertical de estos puede generar hembras con potencialidad infectiva para iniciar nuevos ciclos de transmisión horizontal.

Para comprobar la hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general: Caracterizar la transmisión vertical y horizontal de los virus del dengue, chikungunya y Zika en poblaciones de *Aedes aegypti* de localidades de La Habana en condiciones naturales y de laboratorio.

Objetivos específicos:

1. Determinar la dinámica espacio-temporal de la transmisión vertical de los virus del dengue y Zika en poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana, en condiciones naturales.
2. Evaluar la competencia vectorial de poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana a los virus del dengue, chikungunya y Zika.
3. Caracterizar la transmisión vertical de los virus del dengue, chikungunya y Zika en poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana en condiciones de laboratorio.
4. Determinar la potencialidad de hembras de *Aedes aegypti* infectadas verticalmente con los virus del dengue, chikungunya y Zika para expeler partículas virales infecciosas en la saliva.

Novedad científica

Por primera vez en Cuba se estudia la transmisión de los VDENs, VCHIK y VZIK por *Ae. aegypti*. Se demostró, además la ocurrencia de TV de los cuatro serotipos de dengue y VZIK en poblaciones naturales del vector, y de forma simultánea se estudió su distribución espacio-temporal en territorios de La Habana. Se realizaron por primera

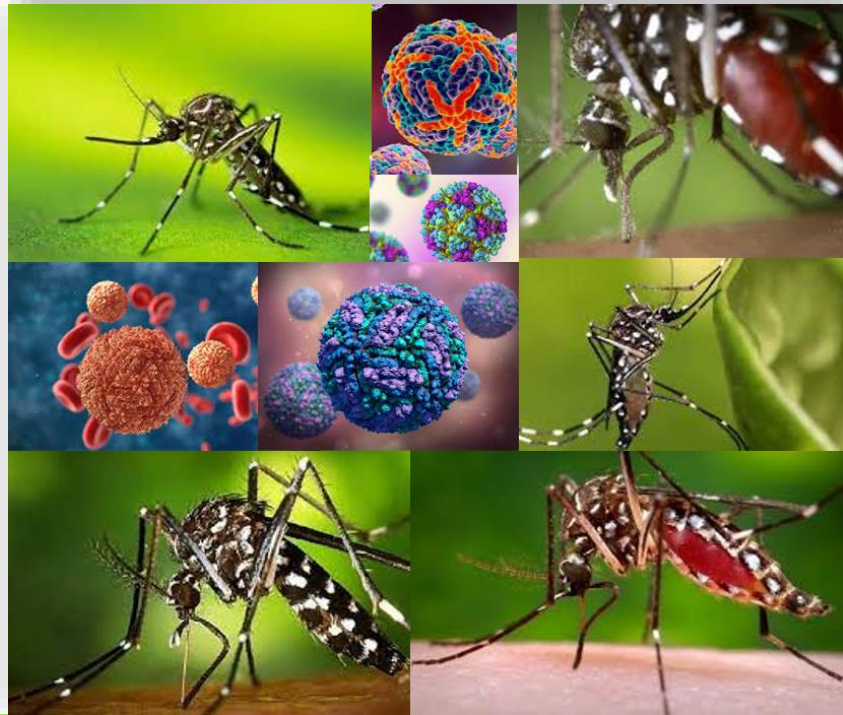
vez ensayos de competencia vectorial de poblaciones cubanas de *Ae. aegypti* a los VDEN-1, VCHIK y VZIK en los que se estimaron las tasas de infección, diseminación y transmisión para estos agentes. Por último, se verificó en condiciones de laboratorio, por primera vez, la habilidad de poblaciones locales de *Ae. aegypti* para transmitir verticalmente los VDEN-1, VCHIK y VZIK, y se comprobó que hembras de esta especie, infectadas verticalmente, pueden excretar partículas virales funcionales de VCHIK y VZIK en la saliva. Los resultados del presente trabajo han permitido la obtención de cinco premios, publicar tres artículos en revistas internacionales y presentar ocho ponencias en eventos internacionales, una tesis de maestría y dos tesis de grado (Avales de la tesis).

Valor teórico

Los resultados obtenidos tienen un importante valor teórico e impacto en el campo de la epidemiología, el diseño de modelos pronósticos y alerta temprana. Esta tesis adaptó un protocolo de trabajo para monitorear la TV de arbovirus en *Ae. aegypti* en condiciones de terreno, que puede generalizarse y ser utilizado en la implementación de un sistema de vigilancia entomo-virológica en Cuba. De igual forma, el protocolo de trabajo para los ensayos de TV, permitirá continuar los estudios experimentales sobre este fenómeno. Por último, el demostrar la potencialidad de la TV de arbovirus en *Ae. aegypti* para generar hembras infectivas capaces de transmitir virus en la saliva, revela otra fuente de infección efectiva de hembras de *Ae. aegypti* además del ya conocido paradigma de infección de mosquitos mediante la alimentación sanguínea sobre un hospedero en fase virémica o transmisión horizontal.

Valor práctico

Esta tesis demostró la importancia práctica del monitoreo de la TV de virus transmitidos por *Ae. aegypti* como una herramienta efectiva en la vigilancia integral de arbovirus, sentando las bases para la introducción paulatina de la vigilancia entomo-virológica en Cuba.



Capítulo I

Revisión Bibliográfica

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Los arbovirus dengue, chikungunya y Zika

El término arbovirus («arbo» acrónimo del inglés *arthropod-borne*) agrupa a los agentes virales transmitidos por artrópodos. Esta denominación reúne aproximadamente a 530 virus de ácido ribonucleico (ARN), de los cuales alrededor de 130 tienen relevancia sanitaria⁽⁵³⁾. Los arbovirus actualmente reconocidos se encuentran en cinco familias, entre las cuales se destacan: Flaviviridae, Togaviridae y Bunyaviridae⁽⁵⁴⁾. De ellas, los géneros que incluyen los virus más importantes desde el punto de vista epidemiológico son: (i) *Flavivirus*, que agrupa los virus de la fiebre amarilla (VFA), dengue (VDENs), Zika (VZIK), Nilo Occidental (VNO), entre otros; (ii) *Alfavirus*, con representantes como los virus chikungunya (VCHIK) O'nyong-nyong (VONN) y Mayaro (VMAY); y (iii) *Orthobunyavirus*, como los virus La Crosse (VLAC), la fiebre del Valle del Rift (VFVR), entre otros⁽⁵⁴⁾. Los VDENs, VCHIK y VZIK se consideran globalmente entre los de mayor relevancia epidemiológica^(3, 4), y se estima que aproximadamente 3900 millones de personas en más de 120 países viven en riesgo de contraer la infección por cualquiera de ellos ⁽⁵⁵⁾.

Mosquitos vectores del género *Aedes* (subgénero *Stegomyia*), especialmente *Aedes aegypti*, son los causantes, en áreas urbanas y periurbanas, de las emergencias y re-emergencias de los arbovirus más notables del siglo XXI (VDENs, VCHIK, VFA y VZIK)⁽⁵⁾. Actualmente, la distribución de esos vectores es la más amplia registrada e incluye América del Norte y Europa⁽⁵⁶⁾. La urbanización acelerada y no planificada, las condiciones socio-económicas inadecuadas, unido al incremento de los viajes internacionales y el cambio climático, están entre las causas fundamentales de la emergencia y expansión geográfica sin precedentes de los arbovirus y sus vectores^(17, 57).

1.1.1 Clasificación, estructura, organización genómica y ciclo replicativo de los virus del dengue, chikungunya y Zika

1.1.1.1 Los flavivirus dengue y Zika

Los virus del dengue (VDEN-1, -2, -3 y -4) y VZIK pertenecen a la familia Flaviviridae (del Latin *flavus* que significa amarillo, debido a la ictericia provocada por el VFA). Junto a ellos se agrupan decenas de entes virales relacionados serológica y genéticamente en el género *Flavivirus*, subdivididos en tres grupos: i) los transmitidos por mosquitos, ii) los transmitidos por garrapatas y iii) los que no tienen vectores conocidos⁽⁵⁸⁾.

Los viriones maduros de los flavivirus son partículas icosaédricas, de alrededor de 50 nm de diámetro con una envoltura lipopolisacáridica^(58, 59) (figura 1.1 A). Su genoma está compuesto por una simple cadena de ARN positivo de ~11 kb, que contiene un único marco abierto de lectura (ORF, del inglés *open reading frame*), y está flanqueada por regiones no traducibles (UTR, del inglés *untranslated regions*) en el extremo 5'UTR y en el extremo 3'UTR⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾. Estos segmentos de ARN subgenómico (sfRNA) incluyen secuencias importantes para la replicación y traducción viral⁽⁶²⁻⁶⁴⁾.

El ARN genómico codifica una poliproteína que da lugar a las diez proteínas virales, que incluye tres estructurales: capsida (C), pre-membrana (PrM) y la envoltura (E) y siete no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5⁽⁶⁵⁾ (figura 1.1 B). Las proteínas estructurales son los componentes esenciales del virión e intervienen en la entrada, fusión y ensamblaje viral. La proteína E tiene un papel definitorio en la alternancia entre hospederos, el tropismo y la virulencia de los flavivirus. Con un peso molecular de 53 kDa, E es una proteína de fusión de membrana, dimérica, N-glicosilada que media la unión al receptor celular. La proteína E posee, además, las mayores propiedades inmunogénicas del virión, confiere respuesta inmune protectora induciendo anticuerpos neutralizantes y antifusión en el hospedero vertebrado⁽⁶⁶⁾.

Los flavivirus entran a la célula hospedera vía endocitosis mediada por receptor⁽⁶⁷⁾. Los receptores y moléculas de unión varían entre los hospederos mamíferos y mosquitos, así como entre virus⁽⁶⁸⁾. Los VDENS se unen a las células diana a través de un grupo estructuralmente diverso de factores de unión⁽⁶⁹⁾. El receptor probable de VZIK en mamíferos es el complejo receptor tirosina-quinasa Gas6-AXL que está presente en cerebro, músculo, tejido reproductivo y placenta^(70, 71).

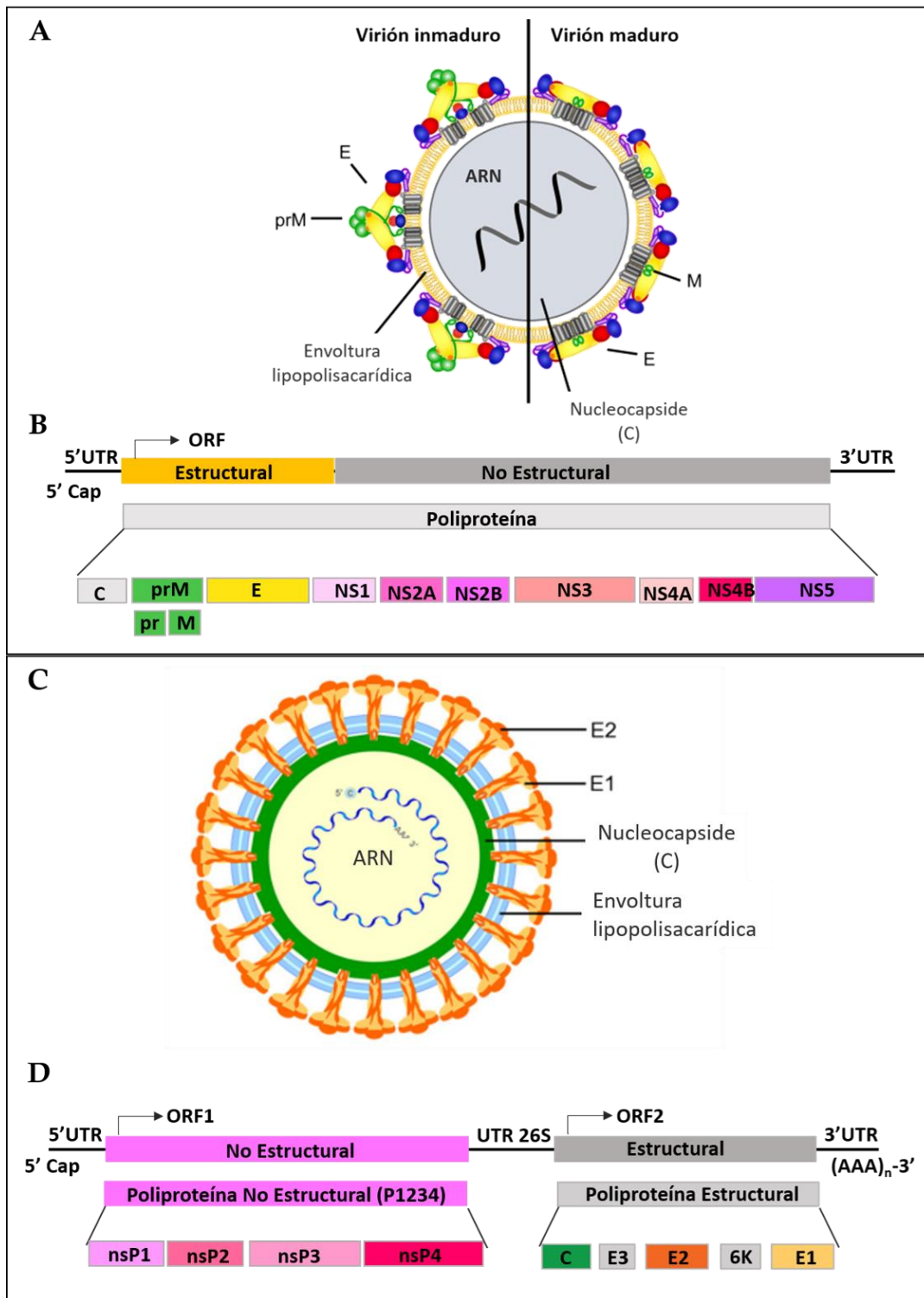


Figura 1.1 Estructura viral (A y C) y organización genómica (B y D) de los flavivirus (panel superior) y del alfavirus chikungunya (panel inferior). A: adaptado de⁽⁷²⁾; B: adaptado de⁽⁷³⁾; C y D: adaptado de⁽⁷⁴⁾.

En ningún caso se identifica un receptor celular definitivo para estos virus^(75, 76); no obstante, se conoce que su internalización ocurre mediada por clatrina⁽⁶⁷⁾.

Una vez internalizada, la partícula viral es expuesta al ambiente ácido del endosoma tardío, lo que provoca la fusión de las membranas viral y celular, y el desensamblaje del virión⁽⁷⁷⁾. La nucleocápside es entonces liberada al citoplasma y el ARN genómico queda descubierto para traducirse en la poliproteína viral. Esta poliproteína es dirigida al retículo endoplasmático (RE) y escindida en las tres proteínas estructurales y las siete no estructurales por peptidasas celulares y la NS3 viral⁽⁷⁸⁾.

Las proteínas no estructurales son los componentes del complejo de replicación viral⁽⁷⁹⁾. NS1 actúa como una proteína de andamiaje que ancla el complejo de replicación viral al RE de la célula huésped⁽⁸⁰⁾. Esta proteína se halla en forma de dímeros de 46 kDa y se puede encontrar tanto intra como extracelularmente. NS2A de 22 kDa es esencial en el proceso de transición entre la replicación y el ensamblaje del ARN viral⁽⁷⁵⁾. NS2B, es una proteína asociada a membrana de 14 kDa que se agrupa con NS3 para formar el complejo de la proteasa viral y le sirve como cofactor en la activación estructural de su serino-proteasa⁽⁶⁶⁾. Por su parte, NS3 es una proteína multifuncional de 70 kDa con actividad proteasa, helicasa y ARN trifosfatasa (RTPasa) que participa en el procesamiento de la poliproteína viral y la replicación del ARN⁽⁷⁵⁾. Las pequeñas proteínas hidrofóbicas NS4A y NS4B, asisten a NS3 durante la replicación viral⁽⁷⁵⁾. Por último, NS5 de ~103 kDa, es una proteína multifuncional y está encargada de la replicación y transcripción viral. Esta enzima es la más conservada entre los flavivirus, tiene en su extremo C-terminal el dominio ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y en el N-terminal la actividad metiltransferasa y guanidiltransferasa, responsable del “capping” y metilación del extremo 5' del ARN genómico⁽⁷⁵⁾.

A partir del ARN intermediario de cadena negativa se sintetizan las cadenas positivas de ARN^(67, 81). Las nuevas moléculas de ARN viral pueden ser usadas para próximas rondas de traducción o para la encapsulación en nuevos viriones⁽⁶¹⁾. El ARN viral es encapsulado por la proteína C, un homodímero de 11 kDa⁽⁶⁶⁾. Seguidamente, la nucleocápside se convierte en un virión envuelto e inmaduro en la membrana del RE⁽⁶⁷⁾. En los viriones inmaduros la proteína E aparece formando proyecciones heterotriméricas con la proteína precursora prM⁽⁷⁶⁾, de ~165 aa y N-glicosilada. Una proteasa furina hospedera

escinde el péptido “pr” de prM, lo que permite generar la proteína M de ~75 aa, que permanece asociada a la partícula viral insertada en la membrana durante los estadios finales del ensamblaje viral⁽⁸²⁾. En la etapa final, los viriones maduros son secretados al espacio extracelular mediante exocitosis ⁽⁶⁷⁾.

1.1.1.2 El alfavirus chikungunya

El virus chikungunya (VCHIK) pertenece a la familia Togaviridae. Este virus se agrupa además dentro de los alfavirus artrítogénicos o del Viejo Mundo, causantes de enfermedades inflamatorias músculo-esquelética en humanos y dentro de los que están además los VONN y VMAY, entre otros⁽⁸³⁾.

El VCHIK es un virus envuelto de 70 nm, de simetría icosaédrica y un genoma ARN monocatenario positivo de 11,8 kb, con una cola de poli A en el extremo 3' y una caperuza en el extremo 5' (figura 1.1 C y D). Esta molécula de ARN contiene dos ORFs: 1) el ORF1 es regulado por el promotor ubicado en la 5'UTR y codifica para una poliproteína no estructural (P1234) que es clivada en cuatro proteínas no estructurales (nsP1-4), y que forman el complejo ARN-replicasa^(84, 85), y 2) el ORF2 próximo al extremo 3', regulado por el promotor subgenómico interno, se transcribe en un sfRNA (26S) positivo que codifica, después de múltiples clivajes y etapas de maduración, para cinco proteínas estructurales: capsídeo (C), tres glicoproteínas de envoltura (E1, E2 y E3) y 6K^(85, 86) (figura 1.1 D). A diferencia de los flavivirus, el genoma de VCHIK contiene tres UTRs: i) la UTR 5', de 76 nucleótidos (nt), ii) la UTR 3' de 526 nt y iii) la restante UTR de 68 nt, se encuentra entre los dos ORF y contiene el promotor del sfRNA que se traduce posteriormente en las proteínas estructurales⁽⁸⁷⁾ (figura 1.1 D).

El virión de VCHIK está integrado por una nucleocápside compuesta por la proteína C. Esta estructura está rodeada por una bicapa lipídica que contiene embebidos los trímeros glicoproteicos formados por tres heterodímeros de las proteínas E1 y E2 ⁽⁸⁶⁾ (figura 1.1 C).

Como en los flavivirus, la entrada de VCHIK a las células diana ocurre por endocitosis mediada por receptor. La proteína viral E2, glicoproteína de transmembrana tipo I, de ~40 kDa, que posee las principales propiedades antigénicas⁽⁸⁵⁾, se une a receptores aun no identificados. La endocitosis de la partícula viral ocurre mediada por clatrina, pero también se ha informado de la entrada viral a la célula, independiente de esta vía⁽⁸⁵⁾.

Dentro del endosoma, el ambiente de bajo pH provoca cambios conformacionales en E1 (~44 kDa), que median la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal del hospedero posterior a la endocitosis viral⁽⁸⁵⁾.

Posteriormente la nucleocápside se desensambla, liberando el genoma viral en el citosol⁽⁸⁸⁾. Por medio del secuestro de la maquinaria traductora celular, se sintetiza rápidamente la poliproteína viral P1234 ⁽⁸⁵⁾, que es subsecuentemente escindida en *cis* por la proteasa nsP2 (~90kDa)⁽⁸⁹⁾, que desempeña cuatro funciones enzimáticas fundamentales: helicasa, nucleótido trifosfatasa, ARN trifosfatasa y proteasa⁽⁸⁹⁾. El clivaje de P1234 ocurre a nivel de la unión nsP3/nsP4, rindiendo P123 y la proteína activa nsP4⁽⁹⁰⁾, de ~70 kDa, encargada de la síntesis del ARN viral, realizado por la RdRp ubicada en su extremo C terminal⁽⁸⁴⁾.

De esta manera ocurre la formación inicial del complejo de replicación viral, que permite la síntesis del ARN viral antisentido que sirve de intermediario para la replicación viral⁽⁹¹⁾. El complejo nsP4-P123 junto con el ARN viral, es entonces reclutado por estructuras conocidas como esférulas, que son invaginaciones de la membrana plasmática que funcionan como protectoras de los intermediarios de ARN de doble cadena, impidiendo su degradación por el sistema inmune innato de la célula hospedera⁽⁹²⁾. A medida que la infección progresa, las esférulas se internalizan, llegando a formar grandes estructuras membranosas conocidas como vacuolas citopáticas tipo I inducidas por virus (CPV-I)⁽⁹²⁾ donde continúa la síntesis del ARN viral luego de la obtención por separado de las otras dos proteínas no estructurales (nsP1 y nsP3). La proteína nsP1 (~60 kDa), es una metil/guaninil transferasa responsable del “capping” del ARN viral y del sfRNA 26S^(89, 93, 94). Por su parte, nsP3 (~60 kDa) participa en la replicación y ensamblaje virales y confiere virulencia a VCHIK⁽⁹⁵⁾.

La traducción de las cuatro proteínas no estructurales, induce un cambio de la actividad replicasa hacia la síntesis de nuevos genomas virales y moléculas de sfRNA 26S^(85, 94, 96, 97). Una vez en el citoplasma, el sfRNA 26S es traducido en la poliproteína estructural de la cual la proteína C (~30 kDa) es inmediatamente auto escindida por su dominio proteolítico⁽⁹⁸⁾. La interacción directa de la proteína C con los nuevos genomas de ARN viral cataliza su oligomerización y el ensamblaje de la nucleocápside⁽⁹⁹⁾. Posteriormente, ocurre la liberación de la proteína accesoria 6K (~6,6 kDa, de función aún

desconocida⁽⁹³⁾) mediada por peptidasas hospederas en el RE, lo que posibilita la asociación de E1, E2 y E3 en un complejo trimérico inmaduro⁽¹⁰⁰⁾. Alternativamente, las glicoproteínas E se organizan y transportan desde el Complejo del Golgi hacia la membrana plasmática en vacuolas citopáticas tipo II, que reclutan las nucleocapsides ensambladas en su cara citoplasmática⁽¹⁰¹⁾. La proteína E3 (~7,4 kDa), que protege y estabiliza los trímeros E2/E1, es liberada por la escisión de una furina hospedera⁽¹⁰²⁾. El dominio hidrofóbico de la proteína C que forma la nucleocapside interactúa con el dominio citoplasmático de E2, lo que promueve la externalización de la partícula de VCHIK que brota de la célula hospedera como un virión maduro^(90, 103).

1.1.2 Origen, distribución geográfica y epidemiología de los virus del dengue, chikungunya y Zika

Se considera que el genoma ARN de la mayoría de los arbovirus favorece la replicación de estos patógenos tanto en hospederos vertebrados como invertebrados, debido a que su plasticidad genética y tasa de mutación son superiores en comparación con los virus ADN⁽¹⁰⁴⁾. La elevada tasa de mutación de los virus ARN, se atribuye a la baja fidelidad de su RdRp, la cual opera en ausencia de actividad correctora e introduce una mutación por cada ciclo de replicación viral⁽¹⁰⁵⁾. Esto provoca la acumulación de genomas virales genéticamente distintos, organizados alrededor de una secuencia consenso en cada hospedero. Se postula que estas variantes intra-hospedero, llamadas también cuasiespecies, interactúan a nivel funcional y colectivamente contribuyen a la adaptación general de la población viral, lo cual tiene importantes implicaciones para la patogénesis del virus y favorece su gran diversidad genética⁽¹⁰⁶⁾. La variación significativa observada en los arbovirus, da lugar a diferentes genotipos y linajes. El uso de las técnicas moleculares permitió determinar la distribución geográfica de estos virus, sus genotipos y linajes, y realizar reconstrucciones filogenéticas que demuestran sus orígenes y patrones de expansión⁽¹⁰⁷⁾.

1.1.2.1 Virus del dengue

Los virus del complejo dengue son considerados los arbovirus más ampliamente distribuidos en el mundo, lo cual se debe a las migraciones humanas, la urbanización descontrolada y no planificada, los conflictos armados, inadecuado manejo de agua y desechos y un insuficiente e insostenible control del vector⁽¹⁰⁸⁾. Las primeras referencias

de la enfermedad por dengue datan de los años 265-420 d.n.e. en China⁽¹⁰⁹⁾. Los siguientes informes aparecieron en el siglo XVII y a partir de entonces describen una enfermedad con una distribución geográfica amplia, que alcanzó proporciones de pandemia a finales del siglo XVIII⁽¹⁰⁹⁾.

El origen geográfico de los VDENS es aun tema de especulación y debate⁽¹¹⁰⁾. Basados en los datos disponibles, es imposible identificar categóricamente a Asia o África como el lugar de origen de estos virus. Algunos autores proponen el origen definitivo en África, basados en la circulación de varios flavivirus transmitidos por mosquitos cercanamente relacionados⁽¹¹¹⁾ y/o el origen africano del principal vector de los VDENS, *Ae. aegypti aegypti*⁽¹¹²⁾; sin embargo, esta hipótesis no está probada⁽¹¹⁰⁾. Se cree que los actuales virus que circulan en el ciclo urbano se originaron de progenitores silvestres⁽¹⁰⁹⁾ que evolucionaron independiente y repetidamente en una serie de eventos de divergencia⁽¹¹⁰⁾. Además, es muy probable que la emergencia de las actuales cepas de DENVs que afectan al humano originadas a partir del ciclo de transmisión selvático, se viera facilitada por la división alopatrica y tal vez ecológica de las cepas selváticas ancestrales de estos virus en poblaciones de diferentes especies de primates no humanos⁽¹¹⁰⁾. La “conquista” de poblaciones de una misma especie (*Homo sapiens*), estuvo favorecida por la limitada protección heterotípica cruzada que cada serotipo viral genera en el hospedero; como consecuencia de la divergencia antigénica que los mismos alcanzaron con anterioridad^(110, 113, 114). El proceso de emergencia fue impulsado además por el encuentro del virus con “nuevas especies” de mosquitos domésticos (*i.e. Ae. aegypti*) y peridomésticos (*i.e. Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895))^(113, 114).

En Las Américas, la historia de las epidemias de dengue se divide en cuatro fases: 1) su introducción (1600-1946), con las evidencias de la asociación entre el dengue y sus formas más severas en los años 1950⁽¹¹⁵⁾; 2) plan continental para la erradicación de *Ae. aegypti* (1947-1970) marcado por la exitosa desaparición del mosquito en 18 países del continente hacia 1962; 3) la reinfestación de *Ae. aegypti* (1971-1999) causada por el fracaso de los programas de erradicación del mosquito y 4) el incremento en la dispersión de *Ae. aegypti* y la circulación de los cuatro serotipos (2000-2010) caracterizada por un marcado incremento del número de brotes y el reporte cada vez en mayor frecuencia de casos graves⁽¹¹⁶⁾. La incidencia global por dengue creció

marcadamente en las últimas dos décadas, con un incremento de más de 10 veces en el número de casos. La región de Las Américas, concentró el 80% de los casos informados mundialmente en el año 2023, con 4,1 millones de casos sospechosos, incluyendo 6710 severos y 2049 muertes⁽⁶⁾.

Actualmente se identifican cinco genotipos (definidos como clados virales que tienen una divergencia entre su secuencia nucleotídica no mayor del 6% dentro de una región dada del genoma⁽¹¹⁷⁾) distintos en cada uno de los serotipos VDEN-1⁽¹¹⁸⁾, VDEN-2⁽¹⁰⁷⁾ y VDEN-3⁽¹¹⁹⁾, mientras que para VDEN-4 se indentifican cuatro (tabla 1.1)^(120, 121). Algunos de estos genotipos son de amplia distribución, mientras que otros están restringidos a localidades particulares, o incluso se consideran extintos como el genotipo IV del serotipo 3⁽¹¹⁰⁾.

1.1.2.2 Virus Chikungunya

El primer informe de una enfermedad compatible con VCHIK data de 1823 en Zanzíbar, costa este africana y que actualmente pertenece a Tanzania⁽¹²²⁾, donde pocos años después fue descrita una epidemia de Fiebre Chikungunya⁽¹²³⁾. Sin embargo, fue durante la epidemia ocurrida entre 1952-1953 en el suroeste de Tanzania que se identificó por primera vez al VCHIK como el agente causal⁽¹²⁴⁾. Poco después de su descubrimiento, se detectaron en Uganda mosquitos de la especie selvática *Aedes (Stegomyia) africanus* infectados con VCHIK, lo cual constituyó la primera evidencia de su transmisión en un ciclo selvático⁽¹²⁵⁾. Posteriormente el VCHIK se encontró en otras regiones de África Subsahariana⁽¹²⁶⁾. La primera epidemia ocurrida fuera de África, se evidenció en 1958 en Bangkok, Tailandia⁽¹²⁷⁾, con otros brotes en los años 1960 y 1970 en la India⁽¹²⁸⁾. El virus se propagó entonces en todo el continente asiático provocando varias epidemias⁽¹²⁹⁾.

En 2004, el virus pareció re-emerger, inicialmente en Kenya, antes de propagarse a territorios del Océano Índico, registrándose millones de casos de infección por VCHIK y la primera descripción de enfermedad grave y muerte relacionada con esta infección⁽¹²²⁾. Durante este brote se aisló una cepa epidémica de VCHIK en la isla La Reunión, donde en 2005 ocurrió una epidemia que afectó al 40% de su población⁽¹³⁰⁾. Esta cepa contiene una mutación en la posición 226 de la glicoproteína de envoltura E1, en la que un residuo de Valina (de la cepa salvaje) es sustituido por uno de Alanina⁽¹³¹⁾.

Tabla 1.1 Genotipos que componen cada uno de los cuatro VDENS y su distribución geográfica mundial.

Serotipo	Genotipo	Origen geográfico	Referencias
VDEN-1	I	Sudeste de Asia, China y el este de África	(118)
	II	Tailandia (décadas de 1950 y 1960)	
	III	Cepas selváticas colectadas en Malasia	
	IV	Islas del Oeste del Pacífico y en Australia	
	V	América, oeste de África y algunas cepas de Asia	
VDEN-2	Asiático 1	Malasia y Tailandia	(107)
	Asiático 2	China, Taiwán, Sri Lanka y Filipinas	
	Cosmopolita	Australia, África, Islas del Océano Pacífico e Índico y Medio Oriente	
	Americano	América Latina, el Caribe, la India e Islas del Pacífico en las décadas 1950 y 1960	
	Asiático/Americano	Aislamientos de origen asiático, y colectados en las Américas	
VDEN-3	I	Malasia, Filipinas, Indonesia y de las Islas del Pacífico Sur	(119)
	II	Tailandia, Bangladesh y Vietnam	
	III	India, Sri Lanka, Samoa, África y aislamientos colectados desde 1994 a la fecha, en Latinoamérica y el Caribe	
	IV	Cepa prototipo aislada en Filipinas en el año 1956 y aislamientos de China y Malasia de los 80	
	V	Puerto Rico de los años 60 y 70, así como un aislamiento de Tahití de 1965	
VDEN-4	I	Tailandia, Filipinas, Japón y Sri Lanka	(120, 121)
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Las Américas y el Caribe	
	III	Aislamientos recientes de Tailandia	
	IV	Aislamientos selváticos colectados en Malasia	

Existe una fuerte evidencia epidemiológica y experimental de que esta es una mutación adaptativa que incrementó la replicación y transmisión en *Ae. albopictus*, vector principal presente en La Reunión⁽¹³²⁾. Posteriormente se identificó un conjunto de mutaciones que secuencialmente incrementaron la adaptabilidad del virus a esta especie⁽¹³³⁾. Los brotes de gran magnitud ocurridos durante este período propiciaron la introducción de VCHIK en regiones más templadas donde *Ae. albopictus* está presente, como por ejemplo el sur de Francia e Italia, que registraron transmisión local y brotes de esta enfermedad, el último con 17 y 277 casos autóctonos respectivamente en 2017⁽¹³⁴⁾.

Entre 2006 y 2011, varios países y territorios de Norte, Suramérica y el Caribe, detectaron casos importados de VCHIK⁽¹³⁵⁾, pero no fue hasta diciembre de 2013 que se anunció la emergencia de VCHIK en Las Américas, al detectarse el primer caso autóctono en Saint Martin, territorio ubicado en el Caribe⁽¹³⁶⁾. Después del primer reporte, VCHIK se expandió a 45 países y territorios de Norte, Centro y Suramérica, causando más de 2900 millones de casos y 296 muertes hasta julio de 2016⁽¹²²⁾. Sin embargo, se considera que el verdadero número de casos está subestimado como resultado de un diagnóstico clínico incorrecto o la falta de informe⁽¹²⁹⁾.

Análisis filogenéticos de secuencias parciales del gen *e1* de VCHIK revelan la existencia de tres genotipos vinculados a su ubicación geográfica: (i) Africano Occidental, (ii) Este, Centro y Surafricano (ECSA) y (iii) Asiático, los cuales comparten un ancestro común en África tropical⁽¹³⁷⁻¹³⁹⁾. Un linaje epidémico adicional conocido como Linaje del Océano Indico (IOL, por sus siglas en inglés), y cuyas cepas forman un grupo monofilético dentro del genotipo ECSA, emergió durante la propagación de VCHIK en el Océano Indico y Asia⁽¹⁴⁰⁾.

1.1.2.3 Virus Zika

El virus Zika fue aislado por primera vez de un macaco *Rhesus* y de mosquitos *Ae. africanus* en el bosque Zika (de ahí su nombre) de Uganda en 1947⁽¹⁴¹⁾. Estudios de vigilancia serológica, identificaron personas inmunes a VZIK al menos en 25 países africanos entre 1945 y 2014, y en siete territorios de Asia entre 1952 y 1997⁽¹⁴²⁾. Aunque los estudios serológicos de este virus deben ser interpretados con cuidado debido a la

reactividad cruzada de los anticuerpos anti-VZIK con otros flavivirus relacionados, la detección directa del virus en países africanos y asiáticos confirman la amplia distribución de este agente por años⁽¹⁴³⁾. Se plantea que el VZIK se expandió de su ciclo enzoótico ancestral en África hacia Asia, hace varias décadas⁽¹⁷⁾.

La primera evidencia de una posible transmisión inter-humana urbana se registró en Malasia en 1966, cuando el virus fue detectado en la especie doméstica *Ae. aegypti*⁽¹⁴⁴⁾. Sin embargo, entre 1966 y 2013 no existió evidencia directa de transmisión por esta especie, lo que pudiera reflejar la ausencia de vigilancia y diagnóstico deficiente o nulo para detectar una circulación endémica o epidémica⁽¹⁷⁾. Los primeros brotes de VZIK fueron documentados en Gabón⁽¹⁴⁵⁾ y Yap^(146, 147) en 2007. En 2013, un gran brote comenzó en la Polinesia Francesa, involucrando aproximadamente 100 mil personas infectadas y mostrando por primera vez evidencias de una enfermedad grave asociada al VZIK: el Síndrome Guillain-Barré (SGB)⁽¹⁴⁸⁾. No fue hasta este momento que el VZIK devino un virus “importante”, ya que anteriormente solo se asoció a una enfermedad febril autolimitada de las áreas endémicas⁽¹⁴⁹⁾. Seguidamente, el virus se expandió por todo el Pacífico Sur y finalmente llegó a Las Américas, causando una epidemia masiva donde la microcefalia congénita fue asociada por primera vez a la infección materna con VZIK⁽¹⁵⁰⁾. En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció la epidemia de VZIK como una emergencia internacional⁽¹⁹⁾. Millones de casos fueron registrados en más de 86 países y territorios, incluyendo las manifestaciones de SGB y el SZC⁽¹⁷⁾.

Hasta la fecha, se reconocen dos genotipos principales de VZIK: africano y asiático^(151, 152). El genotipo africano, se subdivide en dos linajes principales, uno constituido por cepas de África Oriental y el otro por cepas de África Occidental⁽¹²⁹⁾ y es el responsable de causar infecciones en países de estas regiones, con manifestaciones clínicas leves⁽¹⁵³⁾. El genotipo asiático, por su parte, se subdivide en dos linajes principales: asiático, integrado por cepas del suroeste y sureste de Asia, Micronesia, Singapur, entre otras, y el americano, que incluye las cepas de la Polinesia Francesa (probable origen de la epidemia en Las Américas), Centro y Suramérica y el Caribe⁽¹⁵²⁾. El genotipo asiático circula causando brotes importantes caracterizados por manifestaciones leves, pero donde se registraron también las más severas como SZC y SGB^(154, 155).

1.1.3 Enfermedad por dengue, chikungunya y Zika

Las enfermedades provocadas por los VDENS, VZIK y VCHIK son reconocidas como una de las principales causas de emergencia en salud a nivel global por la morbilidad y mortalidad que producen, y el estrés sanitario y socio-económico que conllevan⁽²¹⁾. La infección por estos arbovirus es frecuentemente asintomática u oligosintomática (60 a 80%, respectivamente) aunque puede producir diferentes formas clínicas, que van desde un cuadro leve (que se resuelve espontáneamente en 7-15 días) hasta formas severas y, en algunos casos, la muerte⁽¹⁵⁶⁾. Las enfermedades causadas por arbovirus suelen presentarse en forma epidémica y pueden producir un cuadro clínico muy similar, principalmente durante la fase aguda, dificultando así el diagnóstico clínico y creando problemas para su manejo apropiado⁽¹⁵⁶⁾. Adicionalmente, el diagnóstico serológico puede dificultarse debido a la reactividad cruzada entre virus relacionados (*i.e.* VDENS y VZIK)⁽¹⁵⁷⁾.

Ante la ausencia de fármacos antivirales específicos, el manejo de los enfermos por estas arbovirosis es sintomático y con monitoreo y evaluación constante del paciente durante la fase sintomática de la enfermedad^(18, 158).

1.1.3.1 Enfermedad por los virus del dengue

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos de mayor importancia en humanos⁽¹⁵⁹⁾. El agente etiológico de esta enfermedad es cualquiera de los cuatro serotipos (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 o VDEN-4) que presentan características antigénicas, genéticas y serológicas diferentes⁽¹⁶⁰⁾. La infección con cualquiera de los serotipos puede causar una presentación clínica similar que varía en severidad⁽¹⁸⁾. El dengue se caracteriza por ser una enfermedad febril aguda que se presenta con una forma no severa, en la que se puede observar cefalea, dolor retroorbital, mialgia, artralgia, náuseas, vómitos, petequias y leucopenia⁽¹⁸⁾. Este cuadro puede presentarse con signos de alarma tales como: dolor abdominal intenso y continuo, vómitos persistentes, acumulación de líquidos, sangrado de mucosas, letargo o irritabilidad, hepatomegalia, y aumento progresivo del hematocrito^(18, 161, 162). La enfermedad puede manifestarse como dengue severo, con fuga plasmática⁽¹⁶²⁾, hemorragias graves o compromiso grave de órganos, pudiendo llegar a causar la muerte⁽¹⁸⁾. Durante el año

2023, los casos de dengue severo en Las Américas representaron alrededor del 0,2% de los casos sospechosos, mientras las muertes representaron el 0,05%⁽⁶⁾.

La inmunidad a largo plazo desarrollada en el hombre después de la infección con un serotipo es tipo-específica, y la progresión a DS es frecuentemente asociada con la infección secundaria por un serotipo heterólogo ^(163, 164). Sin embargo, se estima que el 75% de las infecciones anuales son inaparentes ⁽¹⁵⁹⁾. La frecuencia relativa entre los casos inaparentes y asintomáticos en relación con los sintomáticos varía de acuerdo con el área geográfica, el contexto epidemiológico, el estatus inmunológico del paciente y de los serotipos circulantes ⁽¹⁶⁵⁾.

1.1.3.2 Enfermedad por el virus chikungunya

La Fiebre Chikungunya es una enfermedad febril aguda con un período de incubación que dura, como promedio, de cuatro a siete días y una fase aguda de cinco a 10 días^(166, 167). Aunque la enfermedad causada por el VCHIK cuenta con una vacuna recientemente aprobada⁽¹³⁾, el manejo de los pacientes se centra en la administración de analgésicos y antiinflamatorios para mitigar los síntomas⁽¹⁶⁸⁾. El término Chikungunya proviene del lenguaje Makondo y significa “encorvarse”, el cual está referido a la postura que adopta el paciente debido a los fuertes dolores en las articulaciones⁽¹⁶⁹⁾. La proporción de individuos infectados por VCHIK que desarrolla síntomas clínicos y requiere atención médica es superior a la de VDENS y VZIK^(135, 170), con valores que oscilan entre 72-96%^(130, 171-173).

Se reconocen dos etapas de la enfermedad: la fase aguda y la fase tardía con artropatía persistente⁽¹³⁵⁾. En la enfermedad aguda, los pacientes manifiestan un inicio abrupto de los síntomas, caracterizados por fiebre alta (>38,5°C), poliartralgia, dolor de espalda, cefalea y fatiga⁽¹⁵⁶⁾. La poliartralgia representa el síntoma más característico, que puede llegar a ser intensa y producir discapacidad funcional en más del 60% de los casos^(135, 166, 174). Después de la fase aguda, entre el 40-80% de los pacientes pueden padecer crónicamente de manifestaciones articulares por meses y hasta varios años, lo que se denomina la fase tardía de la enfermedad con artropatía persistente^(135, 175-178). Aunque de manera general las muertes por el VCHIK se consideran raras⁽¹³⁵⁾, después de la epidemia registrada en la Reunión, se documentó una alta letalidad relacionada con la infección por el VCHIK en ancianos con condiciones preexistentes como hipertensión

arterial y diabetes^(179, 180), lo que llevó a afirmar que quizás las muertes por VCHIK son subestimadas⁽¹⁸¹⁾.

1.1.3.3 Enfermedad por el virus Zika

La infección por el VZIK es, en la mayoría de los casos, asintomática y solo entre el 20-25% de los infectados desarrollan una enfermedad que habitualmente es leve⁽¹⁶⁾ y autolimitada, con un período de incubación promedio de dos a siete días^(18, 182, 183). La enfermedad tiene un inicio súbito, con exantema de tipo máculo-papular con o sin fiebre de baja intensidad^(154, 184). También pueden presentarse otras manifestaciones, como cefalea, mialgia, náusea, vómitos y poliartralgia, aunque, el dolor tiende a ser menor que en los casos de chikungunya y no incapacitante⁽¹⁵⁶⁾.

Dos síndromes asociados a la infección por VZIK y descritos a partir de los brotes y epidemias de 2013 en adelante, son el SGB y el SZC⁽¹⁷⁾. De ellos, el SCZ sigue siendo el más alarmante de los efectos provocados por la infección con el VZIK y reconoce un conjunto de anomalías en el feto o en el recién nacido^(18, 19). Aunque todavía se desconoce el espectro completo de las manifestaciones fetales como consecuencia de la infección intraútero por VZIK, se describen abortos espontáneos, muertes fetales, alteraciones del SNC y alteraciones articulares en el feto⁽¹⁸⁵⁻¹⁸⁸⁾.

1.1.4 Incidencia de los virus del dengue, chikungunya y Zika en Cuba

1.1.4.1 La incidencia de los virus del dengue en Cuba

Desde el siglo XVIII y hasta mediados del siglo XX (1945) en Cuba se reportaron brotes compatibles con dengue⁽¹⁸⁹⁾. Sin embargo, no es hasta 1977 que por primera vez se confirma a nivel de laboratorio la ocurrencia de una epidemia de VDEN-1 que infectó a casi el 50% de la población con un cuadro benigno⁽²⁰⁾. Posteriormente, en 1981 se produce otra epidemia causada por el VDEN-2, que provocó 158 fallecidos, de ellos 101 niños⁽¹⁹⁰⁾. Posterior a este suceso, en Cuba se desarrolló una campaña de lucha contra *Ae. aegypti*, que permitió que el país se mantuviera libre de transmisión por más de 15 años. Sin embargo, en 1997 se produce un nuevo brote causado por el VDEN-2 localizado en el municipio Santiago de Cuba, con 3012 casos confirmados y 12 fallecidos⁽¹⁹¹⁾. En el año 2000, se reportó la circulación de los VDEN-3⁽¹⁹²⁾ y VDEN-4 en La Habana⁽¹⁹³⁾. Posteriormente, en 2006 hubo un incremento de la transmisión⁽¹⁹⁴⁾, detectándose casos de dengue en ocho provincias del país, donde se aislaron los serotipos 3 y 4⁽¹⁹⁵⁾. A pesar

de los esfuerzos para controlar la transmisión de dengue en Cuba, durante las últimas décadas, se detectó un incremento en la co-circulación de los diferentes serotipos⁽¹⁹⁵⁾. En el año 2016, con la introducción de VZIK, se observó una disminución aparente de la circulación de los VDENS⁽²¹⁾. Sin embargo, durante 2018 y 2019, se observó un incremento de los casos que volvió a descender durante los años epidémicos de Covid-19 en Cuba (2020 y 2021). Desde 2022, este comportamiento cambió, con un incremento notable del número de casos de dengue en la isla y el reporte de circulación de los cuatro serotipos⁽¹⁹⁶⁾.

1.1.4.2 La incidencia del virus chikungunya en Cuba

Los primeros casos de VCHIK en Cuba se detectaron a mediados del año 2014. Todos los casos positivos detectados por el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), en ese año correspondieron a casos importados, principalmente de Venezuela, Jamaica y República Dominicana, aunque también se registraron casos procedentes de Nicaragua, San Vicente y las Granadinas, Alemania e Irlanda⁽¹⁹⁷⁾. La mayoría de los pacientes tenían residencia permanente en La Habana. No obstante, otras 11 provincias también registraron casos importados de VCHIK⁽¹⁹⁷⁾.

Durante el año 2015 Cuba informó 226 casos de infección con el VCHIK⁽¹⁹⁶⁾. De ellos, una parte correspondió a un pequeño brote de Fiebre Chikungunya en la oriental provincia de Santiago de Cuba, el cual se eliminó rápidamente, constituyendo el único evento de transmisión local de VCHIK en Cuba. La cepa aislada se clasificó como perteneciente al genotipo asiático⁽²¹⁾. A partir de esa fecha no se identifica la transmisión de este agente viral en el país⁽²¹⁾.

1.1.4.3 La incidencia del virus Zika en Cuba

La epidemia del VZIK que comenzó en Las Américas a finales de 2015 no tardó en llegar a Cuba, a pesar de los esfuerzos del gobierno cubano por precaver la enfermedad emergente. En el año 2016, precedido por el diagnóstico de casos importados de Fiebre Zika, se confirmó la introducción y transmisión de este virus, la cual se mantuvo y extendió a todo el país⁽²¹⁾. El año 2017 fue el de mayor registro de casos de VZIK, que fueron disminuyendo durante 2018 y 2019. A partir de entonces, Cuba no registra ningún otro caso autóctono de infección con este virus⁽¹⁹⁶⁾.

1.2 Transmisión de arbovirus por *Aedes aegypti*

1.2.1 El mosquito *Aedes aegypti*

1.2.1.1 Origen y distribución de *Aedes aegypti*

Los mosquitos son artrópodos pertenecientes a la clase Insecta, orden Diptera, familia Culicidae. Esta familia agrupa los insectos que poseen piezas bucales en forma de probóscide rígida de tipo picador-chupador. Ella incluye, entre otros, los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*. Dentro de este último, existe un repertorio de alrededor de 800 especies y subespecies distribuidas en 43 subgéneros⁽¹⁹⁸⁾. El mosquito *Aedes aegypti* (subgénero *Stegomyia*) (Linneus, 1762) figura entre las especies más antropofílicas de su género y es vector natural de numerosos arbovirus (*i.e.* VDENV, VFA, VCHIK, VZIK)⁽⁵⁾. Consecuentemente, esta especie constituye un gran riesgo e interés para la salud pública.

Aedes aegypti tiene su origen en África y fue introducido en Las Américas con la trata de esclavos⁽²³⁾. En el continente africano, están presentes dos formas de esta especie que se diferencian por criterios morfológicos y eco-etológicos: i) *Aedes aegypti formosus*, forma ancestral, más oscura, de preferencias tróficas diversas (el hombre y animales), habita tanto en zonas selváticas como urbanas, las larvas se desarrollan en hábitats naturales (huecos de rocas, agujeros de árboles) y artificiales, y de manera general presenta menor susceptibilidad a los arbovirus^(199, 200) ii) *Aedes aegypti aegypti*, forma más clara, doméstica y estrictamente antropofílica, vive en ambientes urbanos. Las larvas se desarrollan en hábitats artificiales como neumáticos usados, y otros recipientes utilizados por el hombre para almacenar agua⁽²⁰¹⁾. La forma doméstica de *Ae. aegypti* que actualmente existe fuera de África, constituye un grupo monofilético⁽²³⁾, lo que revela que el evento de domesticación ancestral de esta especie se produjo una sola vez y todas las poblaciones fuera de África descienden de este único linaje⁽²⁰²⁾.

En la actualidad, *Ae. aegypti* está establecido en 167 países⁽²⁰³⁾, esencialmente en las regiones tropicales y subtropicales (20° S - 30° N) africanas, americanas, asiáticas, australianas y en Oceanía^(24, 204, 205). Las condiciones ambientales idóneas para *Ae. aegypti* se expandieron globalmente a razón de 1,5% por década desde 1950 y esa tendencia se espera que se acelere durante el próximo siglo⁽²⁰⁶⁾. Los patrones de distribución

altitudinal de este culícido también cambiaron, ascendiendo, por ejemplo en Puebla (México), de 1630 msnm en 1987⁽²⁰⁷⁾ a 2133 msnm en 2011⁽²⁰⁸⁾.

1.2.1.2 Ciclo de vida y bioecología de *Aedes aegypti*

El ciclo de vida de *Ae. aegypti* consta de dos etapas bien definidas. La primera está constituida por la fase acuática o inmadura representada por tres estadios diferentes: huevo, larva y pupa; y la segunda, por la fase aérea o adulta (figura 1.2A)⁽²⁰⁹⁾.

De cada huevo nace una larva (figura 1.2A) que inicia un ciclo de cuatro estadios (L1, L2, L3 y L4)⁽²¹⁰⁾. Su desarrollo se completa entre cinco a siete días en condiciones favorables de nutrición y a temperaturas de 25-29°C⁽²¹¹⁾.

Después de la etapa larval, comienza el estadio pupal (figura 1.2A) que dura aproximadamente dos días, en el que no se alimenta⁽²⁴⁾. Durante este estadio, una metamorfosis completa permite al mosquito pasar de un modo de vida acuático a un modo de vida aéreo. En general los machos son los primeros en emerger, tienen una vida más corta y su misión evolutiva es el apareamiento con las hembras, que tiene lugar pocos días después de la emergencia⁽²¹²⁾. En la mayoría de los casos, las hembras se aparean una sola vez y almacenan los espermatozoides en su spermateca⁽²¹³⁾. El ciclo de *Ae. aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación entre 9 a 10 días⁽²¹⁴⁾.

Aedes aegypti no se aleja mucho de sus criaderos. Varias investigaciones concluyeron que las distancias máximas de vuelo están entre 154 y 1207 m⁽²¹⁵⁾. La distancia de dispersión aceptada para este mosquito es de menos de 150 m⁽¹⁰⁹⁾, y la reducción de sitios de cría en áreas con presencia de este vector favorece su propagación⁽²¹⁶⁾.

El adulto o imago (figura 1.2A) es un *mosquito de color negro, de mediano tamaño, aproximadamente entre cuatro y siete mm de longitud*⁽²⁴⁾. *Esta especie es fácilmente distinguible por las escamas blancas en la superficie dorsal del tórax que se disponen simulando una "lira" (figura 1.2B)*⁽²¹⁷⁾. El cuerpo de los mosquitos, como el de todos los insectos, se divide en tres regiones fundamentales: cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza, encontramos las piezas bucales y los órganos sensoriales como los ojos compuestos y las antenas. El tórax está segmentado en tres partes: pro, meso y metatórax y cada uno porta un par de patas. Además, en el mesotórax se inserta un par de alas membranosas.

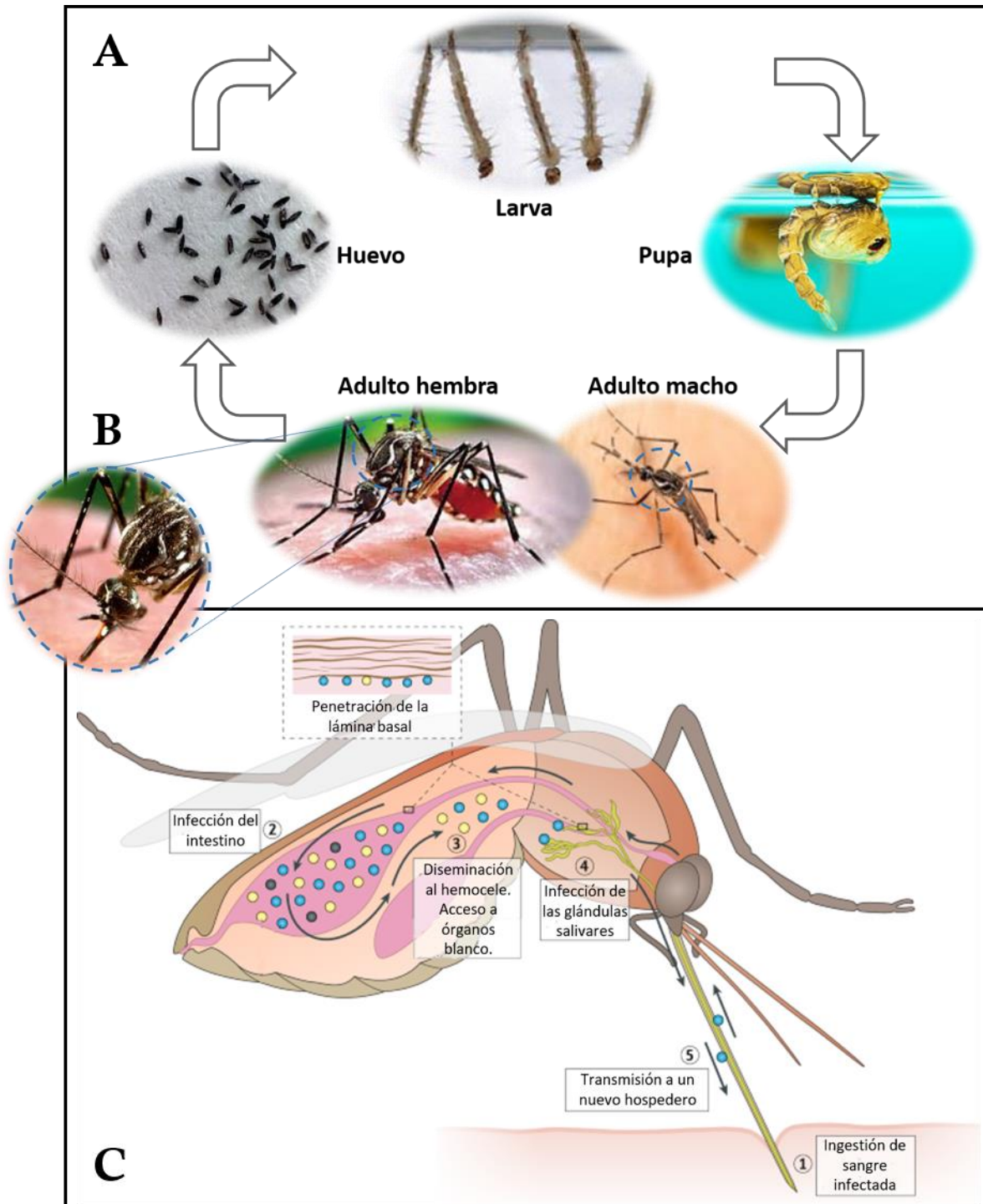


Figura 1.2 Estadios del ciclo de vida (A) y fases de la infección de los arbovirus en *Aedes aegypti* (C, adaptada de⁽²¹⁸⁾). El mosquito *Ae. aegypti* es distinguible por la disposición en forma de lira de las escamas blancas en su tórax (B).

El abdomen se divide en diez segmentos en el que los últimos corresponden a los apéndices genitales⁽¹⁹⁸⁾. La anatomía interna está compuesta por un aparato digestivo que ocupa la mayor parte de la cavidad general del mosquito, al cual llega la toma sanguínea que realizan las hembras. En el tórax se encuentran las glándulas salivares trilobuladas que secretan la saliva liberada en el momento de la picada. La circulación, la respiración y la excreción son aseguradas por la hemolinfa, la red de tráqueas con los espiráculos y los túbulos de Malpighi respectivamente. El aparato genital consta, en las hembras, de dos ovarios y una espermateca, y en el macho, de dos testículos y una vesícula seminal⁽¹⁹⁸⁾.

Las hembras poseen un aparato bucal picador-chupador adaptado a la hematofagia sobre vertebrados⁽²⁴⁾. No obstante, al igual que los machos se alimentan del néctar de las plantas, fuente que le permite la subsistencia por largos períodos de tiempo en ausencia de sangre⁽²¹⁰⁾. Las hembras tienen la capacidad de localizar un humano y alimentarse de su sangre exitosamente, fenómeno que se ha nombrado “búsqueda del hospedero”^(219, 220). Este comportamiento es dependiente de la edad y el estado fisiológico⁽²²¹⁻²²³⁾. Las hembras desarrollan gradualmente su competencia fisiológica y etológica para buscar y alimentarse de la sangre humana después de la emergencia y la cópula, en orden de completar su ciclo gonadotrófico⁽²²⁴⁾. Luego de una alimentación sanguínea completa, se vuelven refractarias al olor del hospedero hasta después de la oviposición⁽²²⁵⁾.

Generalmente, después de cada ingesta completa de sangre, la hembra desarrolla un lote de huevos. Este mosquito puede alimentarse con sangre más de una vez entre cada puesta, especialmente si es perturbado antes de llenarse completamente⁽²²⁶⁾. El ciclo gonadotrófico dura aproximadamente 72 h, pero puede prolongarse a bajas temperaturas⁽²²⁷⁾. Después de una alimentación sanguínea completa, la hembra puede volver a alimentarse en un intervalo de dos a cuatro días⁽²¹⁴⁾. Durante la picada, esta especie inyecta al hospedero invertebrado moléculas anti-hemostáticas que previenen la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y la coagulación⁽²²⁸⁾. La sangre ingerida aporta las proteínas necesarias para la maduración de los huevos antes de su fecundación. Las hembras adultas pueden producir hasta cinco lotes de huevos durante su vida y los depositan en cantidades entre 100-200 por ovipuesta, lo que depende de la cantidad de sangre ingerida⁽²⁴⁾. Además, seleccionan múltiples depósitos con agua para

ovipositar, comportamiento conocido como oviposición saltada⁽²²⁹⁾. Las hembras se alimentan en horario diurno y lugares oscuros, fundamentalmente al amanecer y al anochecer⁽²¹⁴⁾. La longevidad de las hembras puede variar entre una semana y varios meses^(198, 230).

1.2.1.3 *Aedes aegypti* como vector

La habilidad de una especie para transmitir un patógeno, bajo condiciones espacio-temporales dadas, es conocida como capacidad vectorial (CaV)⁽²³¹⁾, la cual es un fenómeno complejo que depende en gran medida de las relaciones entre el patógeno, el vector y su hospedador vertebrado. La CaV es un elemento esencial para caracterizar la dinámica de un sistema vectorial dado y está determinada por factores extrínsecos e intrínsecos (anexo 1.1)^(232, 233). Entre los primeros, se encuentran la temperatura y la humedad, que influyen en la longevidad y abundancia del vector, así como en la duración del período de incubación extrínseco (PIE)^(234, 235). El PIE es una variable clave en la transmisión de un ente infeccioso a un nuevo hospedero y se define como el tiempo que transcurre entre la adquisición del patógeno por el vector mediante la alimentación sanguínea y su posterior excreción en la saliva⁽²³³⁾. Por su parte, los factores intrínsecos están relacionados con las bases genéticas de la especie vectora y el patógeno, los que influyen en la susceptibilidad a la infección y la eficiencia en la transmisión. La habilidad intrínseca de una especie para ingerir, replicar y transmitir un patógeno a un hospedero durante la picadura se define como competencia vectorial (CoV)^(26, 236, 237) (figura 1.2C). Además de los determinantes intrínsecos de origen genético que la controlan, la CoV está modulada por factores extrínsecos y ambientales como la dosis viral ingerida por el vector y la temperatura a la que se somete este sistema biológico⁽²⁶⁾.

Aedes aegypti es el responsable de la mayor parte de la transmisión de los VDENs, VFA, VCHIK y VZIK en todo el mundo, y es casi exclusivamente el vector de las grandes y explosivas epidemias urbanas de estas enfermedades en Las Américas^(5, 25, 238-240). Su alta domesticidad determina su CaV⁽²⁵⁾ y algunos rasgos de su conducta se identifican como potenciadores de la transmisión arboviral. Ellos son: i) la alimentación preferencial de sangre humana^(241, 242), la cual se asocia con una mayor producción de huevos⁽²⁴²⁾; ii) su condición de picadora persistente⁽²⁴³⁾, que realiza varias tomas de sangre hasta llenarse completamente⁽²⁴⁴⁾, a menudo en un mismo día y dentro de una misma casa⁽²⁴¹⁾; iii) la

selección de sus sitios de reposo, en refugios cubiertos, desprovistos del movimiento del aire y de la vista humana⁽²⁴⁵⁾, en zonas preferentemente oscuras y sombreadas⁽²⁴⁶⁾; iv) sus patrones de dispersión en los que se observa que las hembras generalmente permanecen dentro de la casa de liberación o en casas adyacentes⁽²¹⁵⁾; v) amplia distribución mundial a la cual contribuye la explotación que hace de los recipientes artificiales de almacenamiento de agua como sitios de cría^(240, 247); vi) su variada CoV para transmitir además, en condiciones de laboratorio, VMAY^(248, 249) y el orthobunyavirus del lago Ebinur (VLE)⁽²⁵⁰⁾, así como las filarias *Brugia malayi* y *Wuchereria bancrofti*⁽²¹⁰⁾. Adicionalmente se incrimina como vector del virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Colombia, así como de los virus de la Encefalitis Equina del Este y el Oeste⁽²¹⁰⁾.

1.2.1.3.1 Las barreras internas de *Aedes aegypti* a la infección por arbovirus

Como todos los insectos, *Ae. aegypti* posee múltiples barreras anatómicas y fisiológicas, que pueden impedir la invasión y establecimiento de patógenos durante el proceso de infección. El tubo digestivo y las glándulas salivares de la hembra adulta son las dos principales barreras físicas para la transmisión del virus por el mosquito⁽²³¹⁾. La primera barrera física que ofrece el vector es la membrana peritrófica (MP), una gruesa envoltura quitinosa semipermeable compuesta además por proteínas y glicoproteínas. La MP rodea el alimento contenido en el lumen y lo separa del epitelio intestinal⁽²⁵¹⁾. En la hembra de *Ae. aegypti*, la MP es sintetizada en respuesta directa a la alimentación sanguínea y se observa al microscopio óptico o electrónico entre cuatro y ocho horas después de la ingestión de sangre. El papel de la MP como barrera física a la infección por patógenos ha sido ampliamente discutido⁽²⁵²⁾. Algunos autores plantean que la MP es impermeable a partículas del tamaño de virus⁽²⁵³⁾, sin embargo otros afirman que dado el tiempo que tarda la MP en formarse, los arbovirus pueden penetrar e infectar las células del intestino medio antes de su formación⁽²⁵²⁾.

Una vez en el espacio ectoperitrófico, el patógeno encontrará la Barrera a la Infección del Intestino Medio (MIB, del inglés *Midgut Infection Barrier*), la cual limita la colonización de este órgano por el virus⁽²³¹⁾. Los mecanismos moleculares que hacen funcionar la MIB para impedir la entrada de los viriones a las células del epitelio

intestinal no están totalmente dilucidados, aunque se identificaron varias proteínas con un rol potencial como receptores virales de superficie⁽²⁵⁴⁾.

Dentro del epitelio intestinal, el virus se replica y alcanza el sistema circulatorio del mosquito antes de diseminarse e infectar órganos blanco secundarios. Los elementos involucrados en impedir la multiplicación y diseminación viral constituyen la Barrera al Escape del Intestino Medio (MEB, del inglés *Midgut Escape Barrier*)⁽²³¹⁾. Las evidencias disponibles sugieren que la lámina basal (LB) es la ruta crítica en la MEB (figura 1.2C)⁽²⁵⁴⁾. Esta estructura que separa las células del intestino medio del hemocele es una matriz proteica secretada por las células epiteliales en su superficie basolateral⁽²⁵⁵⁾. Entre los mecanismos de diseminación viral propuestos se encuentra el escape a través del complejo traqueo-muscular que rodea el intestino medio y donde la LB es porosa y desordenada, permitiendo el paso a los viriones⁽²⁵⁶⁾. También se hipotetiza que determinadas moléculas señales y efectoras, que se activan en presencia de la replicación arboviral, remodelan la LB de manera que los viriones puedan atravesarla⁽²⁵⁷⁾.

Una vez en la hemolinfa, los arbovirus infectan los hemocitos, el cuerpo graso, el tejido neural y en ocasiones el tejido muscular antes de infectar las glándulas salivares (GS)⁽²⁵⁴⁾. De la misma manera que en el intestino, la LB que rodea las células acinares de las GS debe ser penetrada para que los virus generen una infección en ellas^(258, 259). Los factores que impiden la entrada y replicación viral en las GS constituyen la Barrera a la Infección de las Glándulas Salivares (SGIB, del inglés *Salivary gland Infection Barrier*). Una vez lograda la infección y replicación en las células acinares, los virus son finalmente liberados en las cavidades apicales donde la saliva se acumula antes de su liberación durante la picada a un vertebrado. La barrera que bloquea la liberación de los virus maduros en las cavidades apicales es la Barrera al Escape de las Glándulas Salivares (SGEB, del inglés *Salivary gland Escape Barrier*) (figura 1.2 C)⁽²⁵⁸⁻²⁶⁰⁾.

También existen determinantes virales que permiten burlar las barreras que impone el vector al virus. La composición de la envoltura viral juega un papel fundamental en el cruce de estas barreras tisulares⁽²⁶¹⁾. Por ejemplo, Khoo *et al.*, 2013⁽²⁶²⁾ describieron que con solo la sustitución de un aminoácido cargado (Arg94) por Gln en la glicoproteína E de VDENV-2, el virus experimentó un escape eficiente del intestino medio cuando se

enfrentó a una fuerte MEB en *Ae. aegypti* y por tanto conllevó un aumento de la competencia vectorial en el culícido.

Además de las barreras físicas existen mecanismos inmunológicos innatos que limitan la infección del arbovirus en el vector⁽²⁶³⁾. Las vías de señalización Toll, JAK/STAT e Imd, así como la vía del ARN de interferencia (ARNi), se sugieren como los principales mecanismos de defensa del mosquito frente a la infección viral. Las tres primeras vías se activan por el reconocimiento del patógeno mediante los "receptores de reconocimiento de patrones" y activan una cascada de quinasas y/o proteasas. Estas inducen la translocación de factores de transcripción (Rel 1, STAT y Rel 2 respectivamente) al núcleo y la expresión de efectores antimicrobianos. La vía Toll parece activarse preferentemente durante las infecciones por flavivirus, mientras que la vía Imd parece ser más específica de los alfavirus⁽²⁶⁴⁻²⁶⁶⁾.

La vía ARNi es la mayor respuesta innata antiviral que los vectores usan para restringir las infecciones arbovirales⁽²⁶⁷⁾. Este mecanismo incluye tres vías nombradas por sus ARN efectores: ARN de interferencia pequeño (ARNsi), micro ARN (ARNmi) y ARN interactuante con proteínas Piwi (ARNpi)⁽²⁶⁷⁾. La respuesta ARNsi exógeno es el mecanismo ARNi mejor estudiado y se activa cuando el ARN doble cadena, (intermediario replicativo del virus) es reconocido en el citoplasma de células infectadas, y procesado por varias enzimas y complejos enzimáticos (Dicer-2, R2D2, RISC, Ago2)⁽²⁶⁴⁾.

La vía RNAi resulta primordial en la modelación de la estructura poblacional de los arbovirus. Se hipotetiza que el ataque del genoma viral por la vía del ARNsi puede provocar la rápida aparición de mutantes de escape que permitan al virus eludir la respuesta RNAi del vector⁽²⁶⁷⁾. De esta manera la "pugna" entre la respuesta inmune innata del vector y las contramedidas del arbovirus conducen a la sobrevivencia del mosquito y "permiten" una infección equilibrada que disminuye los posibles costos adaptativos impuestos por el virus al vector, pero mantiene la infección a los niveles necesarios para la transmisión eficaz del arbovirus^(263, 267).

1.2.2 Transmisión de arbovirus en la naturaleza

Cerca del 75% de las enfermedades infecciosas emergentes son enfermedades zoonóticas (que provienen de animales), mayormente de origen silvestre^(268, 269). La mayoría de los arbovirus tienen igualmente un origen zoonótico, y circulan en un ciclo enzoótico (endemia en animales) que involucra aves, roedores o primates no humanos como hospederos reservorios, mayormente en hábitats selváticos^(270, 271). Las infecciones humanas y las epidemias pueden surgir del “desbordamiento” (*spillover* en inglés) directo estocástico de estos ciclos enzoóticos a poblaciones humanas simpátricas o cuando las personas entran en hábitats enzoóticos silvestre^(17, 270). Vectores enzoóticos o “puentes” (transmiten el patógeno adquirido en un ciclo selvático al humano) están implicados en esta transmisión⁽²⁷²⁾. Como se explicó anteriormente, algunos arbovirus emergieron como importantes patógenos humanos al alterar su rango de hospederos desde reservorios enzoóticos en primates no humanos (PNHs) hasta humanos, en un ciclo de transmisión urbana que evoluciona ecológica y separadamente⁽²⁷⁰⁾.

1.2.2.1 Ciclos de transmisión selvática de arbovirus

Muchos arbovirus emergentes y de importancia médica como los VDENS, VCHIK y VZIK tienen su origen en PNHs (i.e. *Erythrocebus patas*, *Papio anubis*, *Chlorocebus spp*, *Cercopithecus spp* y *Macaca spp*), los cuales habitualmente no manifiestan signos de infección, pero desarrollan una viremia suficiente para mantener el virus en la naturaleza^(269, 273). En los hábitats de bosques naturales de los PNHs, mosquitos arbóreos principalmente del género *Aedes* (i.e. *Aedes luteocephalus*, *Aedes taylori-furcifer*, *Ae. africanus*, *Aedes vittatus*⁽²⁷³⁾) transmiten estos arbovirus de un animal infectado a otro no inmune en lo que se conoce como ciclo de transmisión selvático^(270, 271, 274, 275).

En el caso de los VDENS, se demostró la existencia de ciclos selváticos que afectan a PNHs en Asia y África, donde se aislaron los virus tanto de PNHs como de mosquitos selváticos que se alimentan ellos⁽²⁷³⁾. Todavía no existen pruebas fehacientes de la circulación selvática de los VDENS en PNHs del Nuevo Mundo⁽²⁷³⁾.

A diferencia de los VDENS, los ciclos de transmisión selvática de VCHIK⁽²⁷⁶⁾ y VZIK⁽¹⁷⁾ solo están demostrados en África, donde se aisló el virus de mosquitos arbóreos y PNHs. Sin embargo, en el caso del alfavirus, no está claro si los PNHs son los únicos hospederos vertebrados o si otros animales desempeñan un papel en su mantenimiento

silvestre⁽²⁷⁷⁾. Los ciclos selváticos parecen estar ausentes en Asia^(278, 279), aunque existen algunas evidencias de PNHs seropositivos al VCHIK⁽²⁸⁰⁾. En la actualidad, no se ha demostrado de forma concluyente la existencia de ciclos selváticos de VCHIK ni VZIK en Las Américas, aunque se sugiere que aún podrían establecerse debido al elevado número de mosquitos, PNHs y personas susceptibles^(17, 281).

Los ciclos selváticos tienen importantes implicaciones para las infecciones humanas, más allá del fenómeno “desbordamiento”⁽²⁷³⁾. La circulación selvática puede actuar como refugio de arbovirus, y permitir la re-emergencia una vez que las epidemias humanas cesen y la inmunidad poblacional (inmunidad de rebaño) disminuya. Además, pueden proporcionar ambientes selectivos donde nuevas cepas de arbovirus se desarrollen. Esas nuevas cepas también podrían superar la inmunidad desarrollada en respuesta a vacunas diseñadas para cepas urbanas existentes, lo que se denomina redundancia vacunal⁽²⁸²⁾. El estudio de la transmisión selvática de arbovirus, constituye, por tanto, un tema de importancia con relación a la transmisión urbana.

1.2.2.2 Ciclos de transmisión urbana de arbovirus

En ambientes urbanos a escala global, los arbovirus VDENs, VCHIK y VZIK son transmitidos entre hospederos humanos principalmente por el mosquito doméstico *Ae. aegypti*, cuyos hábitos ecológicos favorecen su cercanía al hombre y, por tanto, la transmisión viral^(270, 283). No obstante, *Ae. albopictus* es considerado generalmente un vector secundario, aunque en territorios libres de *Ae. aegypti*, el “mosquito tigre” (como se le conoce) juega un rol protagónico en la transmisión^(283, 284). Durante la epidemia de VCHIK en La Reunión en 2005, *Ae. albopictus* se convirtió en el principal vector del virus dada la mutación ocurrida en la glicoproteína de envoltura viral E1^(132, 285). Los ciclos de transmisión urbana de arbovirus en regiones tropicales densamente pobladas pueden resultar en epidemias y pandemias explosivas, aunque bajos niveles de transmisión también pueden ser suficientes para mantener los virus en la población. Algunos arbovirus como VDENs, VCHIK y VZIK, se han adaptado totalmente a los ciclos urbanos y ya no necesitan de los PNHs, mosquitos arbóreos ni ciclos selváticos para su mantenimiento^(142, 270).

1.2.2.3 Transmisión horizontal de arbovirus

Los arbovirus VDENS, VCHIK y VZIK se mantienen en el ciclo urbano principalmente mediante la transmisión horizontal entre la hembra de *Ae. aegypti* y el hombre (figura 1.3A)⁽²⁸⁶⁾. El mosquito se infecta al alimentarse con sangre de un humano en fase virémica (figura 1.2C). Una vez que el virus ingresa en el mosquito se inicia el PIE que puede durar varios días (entre cuatro y siete para los VDENS⁽²⁸⁷⁾, tres y 14 para VZIK^(288, 289), y mucho más corto entre dos y tres para VCHIK^(290, 291)) en dependencia de disímiles factores abordados anteriormente⁽²⁹²⁾.

La interacción del virus con su vector es un fenómeno clave en la transmisión de los arbovirus, pues para que esta sea efectiva, deben ocurrir determinados eventos que permitan al virus completar su ciclo dentro del vector⁽²¹⁸⁾. Cronológicamente, después que la sangre infectada es ingerida por el mosquito, el virus infecta las células epiteliales del intestino medio donde se replica. Posteriormente, la progenie viral es liberada al hemocele y se disemina a través de la hemolinfa a los órganos blanco secundarios (tráquea, cuerpo graso, musculatura torácica, túbulos de Malpighi, ovarios, sistema nervioso) hasta que finalmente llega a las glándulas salivares donde su replicación y deposición en las cavidades apicales de las células acinares permiten su inoculación mediante la saliva a un nuevo hospedero durante la picadura (figura 1.2 C)⁽²⁶³⁾.

1.2.2.4 Transmisión inter-vectorial de arbovirus

La transmisión intervectorial incluye todas las vías que permiten el contagio entre mosquitos. Las rutas aceptadas hasta el momento incluyen la TV (de parentales a descendencia) y la venérea (TVN) (durante la cópula), las cuales constituyen mecanismos “alternativos” de transmisión de arbovirus para mantenerse en una población de vectores independiente de la alimentación sobre humanos en fase virémica (figura 1.3A)⁽²⁹³⁾. Aunque estas vías de transmisión intervectorial revelan la complejidad de la dinámica de transmisión de los arbovirus, su contribución a la cadena de transmisión humano-mosquito y a la epidemiología de las enfermedades arbovirales permanece aún poco estudiada^(1, 17).

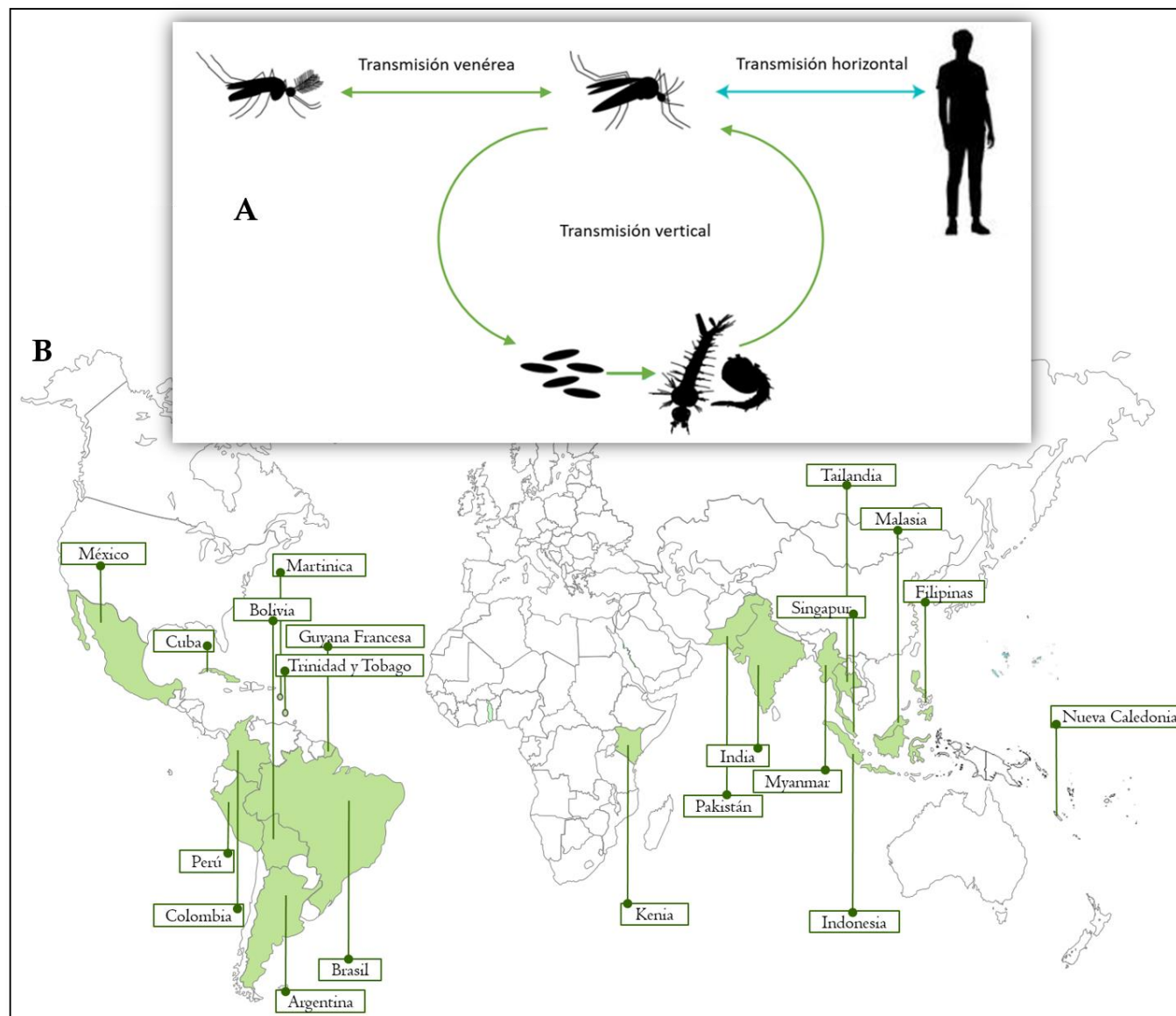


Figura 1.3 A: Modos de transmisión de arbovirus en *Aedes aegypti*. B: Distribución de los registros globales de transmisión vertical de los virus del dengue, chikungunya y Zika en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (7-9, 294, 295).

1.2.2.4.1 Transmisión vertical de arbovirus

El mantenimiento de los arbovirus en áreas endémicas durante condiciones desfavorables para la actividad vectorial es una evidencia epidemiológica que hace sospechar la presencia de otras rutas de transmisión⁽¹⁾. Se postulan varias teorías para explicar el mantenimiento de los arbovirus durante períodos inter-epidémicos, tales como la reintroducción del virus, la circulación en otras especies que actúan como reservorios y mecanismos alternativos de transmisión⁽¹⁾. Estudios filogeográficos de secuencias de aislamientos virales en humanos, colectados antes, durante y después de epidemias de VDENV, hallaron que, a pesar del grado de mutación del virus, la entidad viral fue la misma a lo largo del tiempo en cada lugar^(296, 297). Esto sugiere que el virus se mantuvo localmente a pesar de la ausencia de condiciones para la TH⁽¹⁾.

De esta manera, la TV de arbovirus en poblaciones de mosquitos se propone como un mecanismo que garantiza el mantenimiento del virus en la naturaleza durante condiciones adversas para la TH⁽³⁰⁾. La hembra de *Ae. aegypti* es capaz de transmitir los virus verticalmente a su descendencia, después de haberse infectado, ya sea mediante alimentación o inoculación intratorácica en condiciones de laboratorio⁽²⁷⁻²⁹⁾. Este fenómeno está descrito también en la naturaleza por estudios que comprueban la presencia de VDENVs, VCHIK y VZIK en larvas y machos adultos colectados en el terreno⁽³¹⁻³³⁾ (figura 1.3B). Varios autores sugieren que la TV favorece la circulación endémica de estos virus^(39, 42), lo cual pudiera explicar que los países con mayor cantidad de registros de TV en mosquitos están ubicados en zonas consideradas endémicas o hiperendémicas como Latinoamérica^(38, 41, 298, 299) y el Sudeste asiático^(31, 300, 301) (figura 1.3B).

La TV de arbovirus en mosquitos ocurre generalmente por vía materna y a través de dos principales mecanismos: transmisión transovárica por la cual el virus infecta los tejidos germinales de la hembra y la transmisión trans-huevo por la cual el virus infecta los huevos durante la fertilización o la oviposición a partir de tejidos adyacentes infectados⁽³⁰²⁾. No obstante, algunos autores declaran que la TV no ocurre en determinadas poblaciones de mosquitos o que en algunos contextos ocurre con baja frecuencia⁽³⁰³⁻³⁰⁷⁾.

En Cuba, se confirmó por primera vez la TV del VDEN-3 (genotipo III) en mosquitos *Ae. aegypti* de La Habana en 2013, durante una epidemia que involucró a toda la región latinoamericana⁽⁵²⁾. Las consecuencias epidemiológicas de la TV de los arbovirus en mosquitos han sido insuficientemente exploradas, y este continúa siendo un asunto controversial⁽³⁰⁾. De cualquier manera, la posibilidad de que una hembra de *Ae. aegypti* infectada verticalmente pueda ser infecciosa inmediatamente después de haber emergido, sin tener que ponerse en contacto previo con un humano en fase virémica, multiplica el riesgo de transmisión de este virus^(43, 308). Además, la detección de TV de los VDENS en la naturaleza se propone como una herramienta para los sistemas de vigilancia y alerta temprana de brotes^(309, 310).

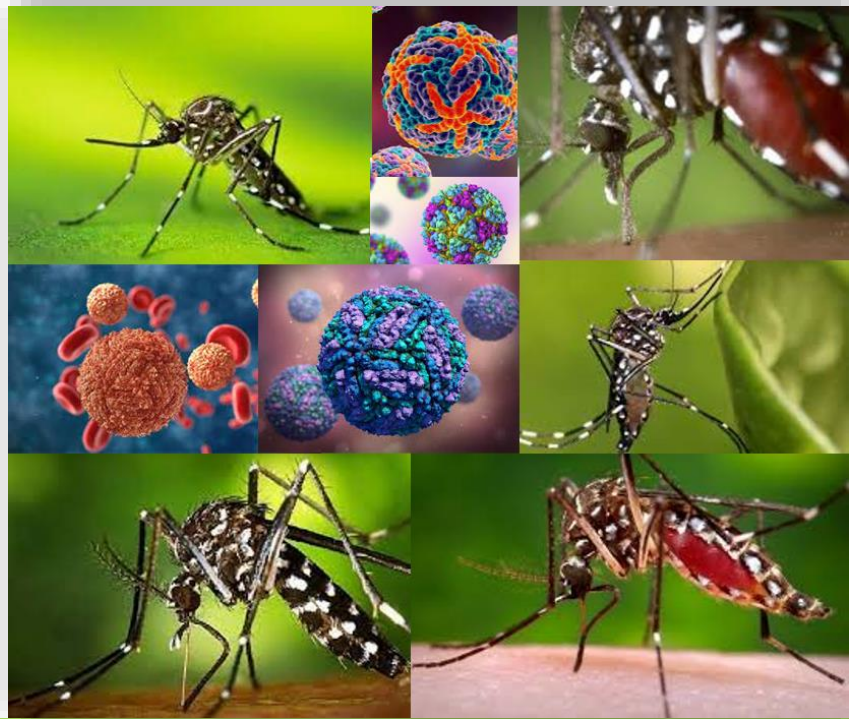
En la actualidad existen limitados recursos preventivos y terapéuticos específicos disponibles para hacer frente a los VDENS, VCHIK y VZIK, y su control se basa fundamentalmente en estrategias integradas para la disminución de las poblaciones de *Ae. aegypti* y consecuentemente disminuir su transmisión⁽²²⁷⁾. Así, es cada vez más urgente el desarrollo de investigaciones encaminadas a profundizar en el conocimiento de la transmisión de estos arbovirus y mejorar los sistemas de vigilancia que faciliten el monitoreo de la situación epidemiológica y permitan dar una respuesta eficiente para el control de los brotes.

1.2.2.4.2 Transmisión venérea de arbovirus

La TVN consiste en la transferencia del agente infeccioso entre mosquitos adultos de distintos sexos durante el apareamiento (figura 1.3A)⁽³¹¹⁾. Pocos estudios abordan esta vía de contagio, sin embargo, la TVN se demostró en las especies de mosquitos *Aedes triseriatus*⁽³¹²⁾, *Aedes austalis*⁽³¹³⁾ y *Culex bitaeniorhynchus*⁽³¹⁴⁾ con bunayvirus (LCV), alfavirus (virus Sindbis) y flavivirus (virus de la encefalitis japonesa) respectivamente. Asimismo, varios experimentos demostraron la capacidad de *Ae. aegypti*⁽³¹⁵⁻³¹⁹⁾ y *Ae. albopictus*⁽³²⁰⁾ machos de transmitir los VDENS, VCHIK y VZIK a hembras y viceversa. En la mayor parte de los estudios, los machos de *Ae. aegypti* se infectaron intratorácicamente^(315, 318, 319), mientras que, en solo uno, los machos demostraron su capacidad de infectar hembras durante la copula después de adquirir verticalmente la infección⁽³¹⁷⁾. Estos hallazgos refuerzan la potencialidad de la TVN como una fuente de infección de mosquitos hembras para desencadenar brotes de arbovirus.

1.2.2.5 Transmisión no vectorial de arbovirus

La transmisión no vectorial (sin la participación de vectores) de arbovirus de varias familias está registrada, aunque no en todos los casos muestra la misma frecuencia ni explota las mismas vías⁽³²¹⁾. El contagio no vectorial de VDENV y VCHIK entre humanos se considera muy raro, aunque se describió transmisión sexual y fetal de los VDENV^(322, 323), así como transmisión sanguínea, fetal e intraparto de VCHIK⁽³²⁴⁾. Sin embargo, la transmisión sexual y fetal de VZIK entre humanos está bien documentada (revisado en⁽³²⁵⁻³²⁷⁾). Aunque las vías no vectoriales de transmisión poseen importancia para la ciencia y patogenia de estos virus, no han constituido la causa de brotes de estos patógenos⁽³²⁵⁾.



Capítulo II

Materiales y Métodos

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo de estudio

El presente estudio posee un diseño híbrido que combina dos encuestas transversales repetidas para explorar la distribución espacio-temporal de los virus del dengue y Zika en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* en áreas de La Habana, Cuba; con dos estudios experimentales anidados para evaluar la competencia vectorial y transmisión vertical de los virus del dengue, chikungunya y Zika en poblaciones de *Ae. aegypti* de La Habana.

2.2 Declaraciones éticas

La investigación de terreno del presente estudio fue aprobada por el Comité de Ética de la Investigación del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” en su dictamen CEI-IPK 13-18. La colocación de ovitrampas en el interior de las viviendas, contó en todos los casos con el consentimiento informado de sus moradores. Los estudios de competencia vectorial y transmisión vertical en condiciones de laboratorio fueron aprobados por el Comité de Ética interno del Instituto Pasteur de Guadalupe, Francia. Dos donantes voluntarios proporcionaron su consentimiento escrito para la donación de sangre para los experimentos de alimentación artificial de los mosquitos. La exportación de los huevos de *Ae. aegypti* al Instituto Pasteur de Guadalupe contó con los permisos de los Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), Centro de Seguridad Biológica y el Instituto de Medicina Veterinaria de Cuba.

2.3 Estudios en condiciones naturales, La Habana, Cuba

2.3.1 Diseño temporal del estudio

El estudio se desarrolló en dos momentos epidemiológicamente distintos (figura 2.1):

1. Periodo septiembre 2013 - julio 2014. Circulación exclusiva de los VDENs en Cuba marcado por un incremento de casos de dengue en las Américas antes de la entrada de los VCHIK y VZIK en la región⁽²¹⁾. El 14 de enero de 2013 entró en vigor la reforma migratoria en Cuba que facilitó la entrada y salida de cubanos a todas las regiones del mundo⁽³²⁸⁾ y con ello el incremento del riesgo de introducción de patógeno

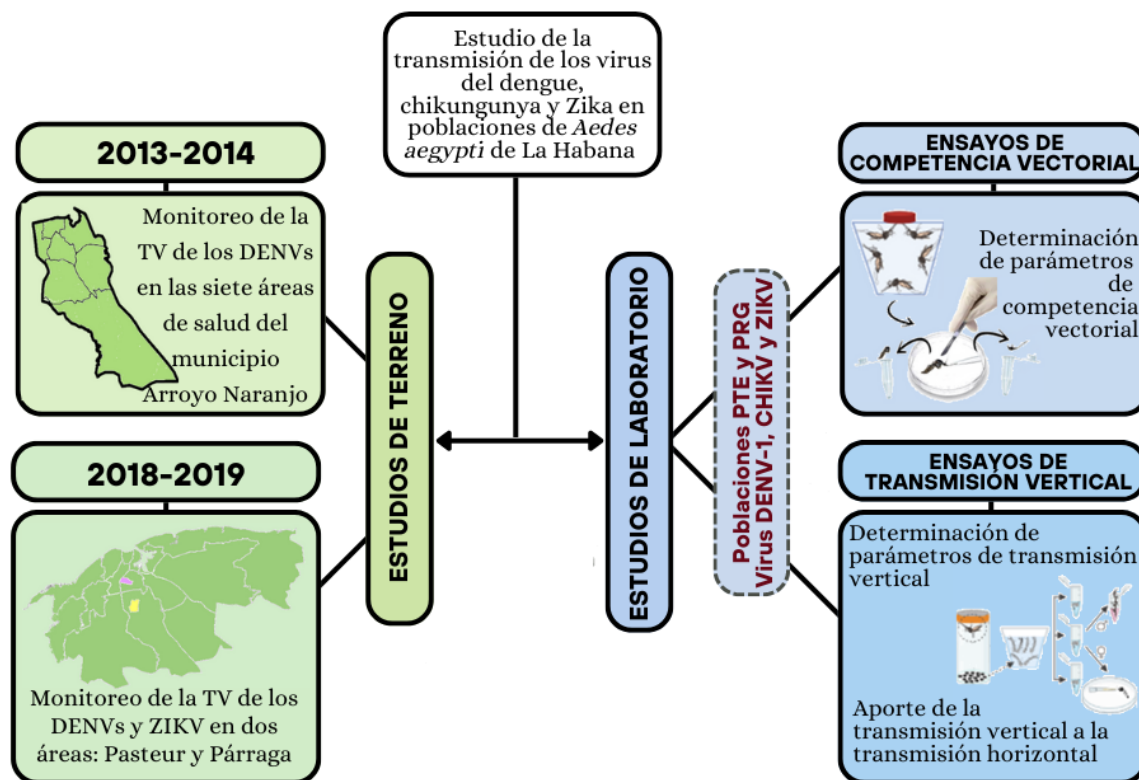


Figura 2.1 Esquema del diseño general del estudio de la transmisión de arbovirus en poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana. A la izquierda y en color verde se encuentran representados los estudios en condiciones naturales, en sus dos momentos epidemiológicamente distintos: 2013-2014 (estudios exploratorios de monitoreo de transmisión vertical (TV) de los virus del dengue (VDENs)) y 2018-2019 (estudios de TV de los VDENs y el virus Zika (VZIK)). A la derecha y en color azul, se hallan los estudios en condiciones de laboratorio desarrollados con las poblaciones de *Aedes aegypti* colectadas en las áreas Pasteur, del municipio Diez de Octubre y Párraga, del municipio Arroyo Naranjo respectivamente, ambos en La Habana, Cuba. En los ensayos de competencia vectorial y transmisión vertical, las poblaciones de mosquitos fueron expuestas a los virus dengue-1 (VDEN-1), chikungunya (VCHIK) y VZIK.

2. Periodo mayo 2018 – marzo 2019. Co-circulación de los VDENs y VZIK, precedido por un incremento de los casos de VZIK durante 2017, que fue disminuyendo progresivamente hacia 2019⁽²¹⁾. Durante este periodo, ni desde su introducción en Las Américas, se registraron casos autóctonos de VCHIK en La Habana⁽²¹⁾.

2.3.2 Descripción de las áreas de estudio

El estudio varió sus zonas de pesquisa durante cada periodo referido en la sección 2.3.1. Periodo septiembre 2013 - julio 2014: El estudio se realizó en el municipio Arroyo Naranjo, ubicado al centro sur de la provincia La Habana y considerado uno de sus municipios periféricos. Limita al norte con el municipio Diez de Octubre, al sur con los municipios San José de las Lajas y Bejucal (Provincia Mayabeque), al este con los municipios San Miguel del Padrón y Cotorro; y al oeste con el municipio Boyeros (figura 2.2). Posee una extensión de 82,2 Km², y ocupa el 9% del territorio provincial⁽³²⁹⁾. El municipio cuenta con un área urbana de 3184 ha y una rural mayor de 3378 ha. Durante el período de estudio, poseía una población residente de 203 327 habitantes y una densidad poblacional de 2474,2 hab/km²⁽³²⁹⁾. El territorio está dividido en 10 Consejos Populares y se caracteriza por un alto porcentaje de zonas suburbanas (siete comunidades especiales y cinco de tránsito)⁽³²⁹⁾. La población es atendida en siete áreas de salud: Mantilla, Párraga, Julián Grimau, Los Pinos, Capri, Eléctrico y Managua (figura 2.2). Algunos datos demográficos de estas áreas se muestran en el anexo 2.1.

La selección del área de estudio estuvo determinada por dos factores fundamentales: i) Arroyo Naranjo ha mantenido históricamente elevados valores de Índice Casa (IC), indicador entomológico que refleja la proporción de casas con presencia de larvas y pupas de *Ae. aegypti* en un área determinada^(330, 331). ii) Anualmente este municipio confirma un elevado número de casos de dengue⁽³³²⁾. En septiembre/2013 era uno de los cuatro municipios de La Habana con mayor riesgo de transmisión⁽³³³⁾.

Periodo mayo 2018 – marzo 2019: El estudio se realizó en dos áreas de salud de la provincia La Habana, Cuba: Louis Pasteur del municipio Diez de Octubre y Párraga del municipio Arroyo Naranjo (figura 2.2). Ambas áreas se seleccionaron teniendo en cuenta

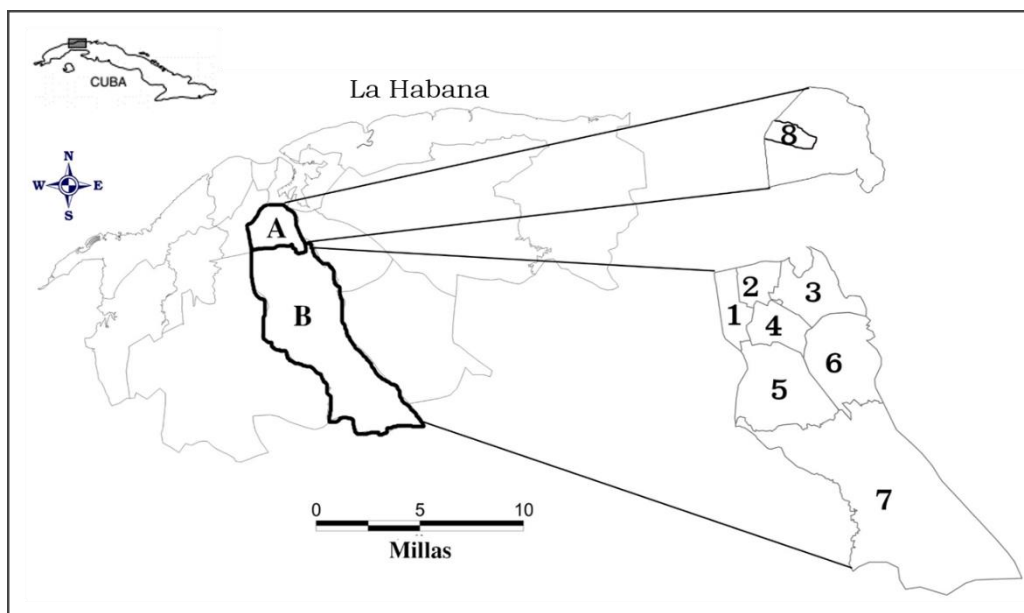


Figura 2.2 Mapa de la provincia La Habana con la ubicación de los municipios Arroyo Naranjo (B) y Diez de Octubre (A). Las divisiones dentro de cada municipio indican las áreas de salud estudiadas (1: Los Pinos, 2: Julián Grimau, 3: Mantilla, 4: Párraga, 5: Capri, 6: Eléctrico, 7: Mangua, 8: Louis Pasteur).

el número de casos confirmados de dengue entre 2010 y 2017 y según criterio opinático de los directivos de la Dirección Provincial de Higiene y Epidemiología de La Habana. El área de salud Párraga (alta transmisión) confirmó cuatro veces más casos de dengue que el área de salud Pasteur (baja transmisión) durante 2017⁽³³⁴⁾.

El área de salud Pasteur posee una extensión territorial de 1,5 km² y 106 manzanas, mientras que Párraga abarca un área de 2,5 km² y cuenta con 255 manzanas. Con el fin de que los territorios muestreados tuvieran dimensiones análogas, se seleccionó una porción del área de salud Párraga similar en extensión y número de manzanas que Pasteur. Algunos datos socio-geográficos de las áreas de estudio se muestran en el anexo 2.2.

2.3.3 Colecta de mosquitos y preparación de las muestras entomológicas

El estudio varió sus métodos de colecta durante cada periodo referido en acápite 2.3.1.

Periodo septiembre 2013 - julio 2014: Las larvas y pupas se colectaron mensualmente por los operarios del Programa de Control de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* del Ministerio de Salud Pública en todas las áreas de salud del municipio Arroyo Naranjo,

como parte de sus actividades de rutina⁽³³⁵⁾. Los individuos colectados en el mismo sitio de cría (larvas y pupas) constituyeron una muestra, que se etiquetó con la fecha, lugar y recipiente de colecta. Los especímenes que se clasificaron como *Ae. aegypti*⁽²¹⁷⁾ por los especialistas del Departamento de Vigilancia y Lucha Antivectorial municipal, se conservaron en etanol 70% y se almacenaron a 4°C antes de enviarse a la Unidad Provincial de Vigilancia y Lucha Antivectorial para el control de la calidad. Las muestras re-clasificadas como *Ae. aegypti* se contaron y se enviaron al Departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), donde se conservaron en las condiciones antes descritas hasta su procesamiento. Los datos que acompañaban cada muestra se almacenaron en la base de datos del laboratorio. Cada sitio de colecta fue geo-referenciado mediante el Sistema de Información Geográfica MapInfo v.11.0⁽³³⁶⁾. Con las muestras entomológicas recibidas se formaron grupos mixtos (larvas y pupas), de entre 30-55 individuos, según la disponibilidad de ejemplares, colectados en el mismo mes y área de salud siempre provenientes manzanas adyacentes. Se formaron grupos con menos de 30 especímenes cuando en un mes y área de salud la cantidad de mosquitos no alcanzó una cifra mayor que 30.

Periodo mayo 2018 – marzo 2019: Se colectaron huevos de *Ae. aegypti* mediante ovitrampas en cada área de salud mensualmente a lo largo del estudio. En la pared interior de cada ovitrampa, se colocaron tiras de papel con dimensiones de 40 cm x 5 cm, el cual sirvió como sustrato para la oviposición y se añadieron 500 mL de agua. Cada ovitrampa y su tira de papel respectiva se marcaron con un código de identificación y georreferenciación en el momento de su emplazamiento. Las ovitrampas se colocaron en el interior de viviendas y otros locales como bodegas, consultorios médicos, centros de trabajo, etc, escogidos al azar durante el periodo de estudio. Cada mes se colocaron aleatoriamente 25 ovitrampas en igual número de manzanas de cada área de salud. Las ovitrampas permanecieron en los locales donde se ubicaron durante una semana, y al cabo de este tiempo, fueron retiradas por investigadores del IPK de conjunto con los operarios del Programa de Control de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* de las áreas de salud respectivas. Las tiras de papel con los huevos colectados correspondientes a cada ovitrampa se trasladaron al Departamento de Control de Vectores del IPK, donde permanecieron en un ambiente de humedad durante 72 h para garantizar la maduración

del embrión. Posteriormente, los huevos colectados en cada ovitrampa se contaron bajo un estereoscopio y se sumergieron en agua de cloro a 37°C en recipientes cilíndricos con un área de 95 cm² en una relación aproximada de 80 huevos en 300 mL de agua. A cada recipiente se le añadieron 16 mg de harina de pescado para propiciar la eclosión de los huevos, siguiendo normas descritas⁽³³⁷⁾. Los recipientes de cría se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (28±1°C), humedad relativa (80%) y ciclo de luz/oscuridad (12h:12h). El desarrollo larvario fue observado cada 24 h y al séptimo día los especímenes fueron sacrificados e identificados taxonómicamente en los estadios de L4, pupa o adulto indistintamente empleando un estereoscopio⁽²¹⁷⁾. Los especímenes clasificados como *Ae. aegypti* fueron conservados en grupos de hasta 39 individuos colectados en el mismo mes y área de salud, siempre provenientes de una misma ovitrampa u ovitrampas adyacentes. Estas muestras fueron rotuladas y conservadas en viales a -80°C hasta su procesamiento.

2.3.4 Estimación de la abundancia relativa de *Aedes aegypti* en las áreas Pasteur y Párraga en el periodo 2018-2019

El diseño de la colecta de mosquitos basado en ovitrampas permitió estimar las abundancias relativas de las poblaciones de *Ae. aegypti* en las áreas de estudio mediante el cálculo de los índices de ovitrampa positiva (IOP) e índice de densidad de huevos (IDH)⁽³³⁸⁾.

Una vez que se contabilizaron los huevos colectados en cada área de salud, se estimaron mensualmente el IOP, que representa el porcentaje de ovitrampas con al menos un huevo; y el IDH calculado como el total de huevos colectados en un mes dividido entre el número de ovitrampas positivas. Los índices se compararon entre las áreas a través de un ANOVA de un factor utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8.0.2⁽³³⁹⁾.

2.3.5 Distribución espacio-temporal de los virus del dengue y Zika

2.3.5.1 Extracción de ARN viral de los grupos de *Aedes aegypti*

Los grupos de mosquitos formados tras la colecta en ambos periodos, fueron procesados para la extracción del ARN viral. Cada grupo se maceró en 200 µL de medio esencial mínimo (Gibco, Alemania) suplementado con suero fetal bovino 2% y Pen Strep 0,2% (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina) (Gibco, Alemania) empleando un

homogenizador automático Tissue Lyser (Quiagen, Alemania) durante 3 minutos a una frecuencia de 3 Hz. El homogenado se centrifugó a 13000xg, por 15 min, a 4°C y el sobrenadante se conservó a -80°C.

La extracción del ARN viral de cada grupo se efectuó en un extractor automático Qiacube (Qiagen, Alemania). Para ello se utilizó el estuche comercial *QIAamp viral RNA* (Qiagen, Alemania) y 140 µL del sobrenadante del homogenado de cada grupo y se procedió según las indicaciones del fabricante. El ARN obtenido se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

2.3.5.2 Detección y secuenciación de los virus del dengue en grupos de *Aedes aegypti*

2.3.5.2.1 Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa

Un fragmento del gen *c-prm* del genoma viral se amplificó a través de una Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) anidada a punto final, según el protocolo descrito por Lanciotti *et al.*, 1992⁽³⁴⁰⁾. La primera reacción de la PCR anidada consistió en una transcripción reversa (RT, de sus siglas en inglés) seguida de la reacción de amplificación. Se utilizó el estuche comercial *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, Alemania) y el termociclador QCylerII (Quanta Biotech, Reino Unido) según recomienda el fabricante. Se preparó, para cada muestra, una mezcla que contenía tampón de reacción (1X), solución equimolar de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, por sus siglas en inglés) (400 µmol/L cada uno), 1 µmol/L de los cebadores D1 (sentido: 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3') y D2 (antisentido: 5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3'), inhibidor de ARNasa (5 U), 2 µL de la mezcla de enzimas y agua libre de nucleasas hasta completar 40 µL. Posteriormente, se adicionaron 10 µL del ARN extraído (sección 2.3.5.1) para un volumen final de reacción de 50 µL. El programa de la RT-PCR incluyó: incubación inicial a 50°C por 30 min, un paso de desnaturalización a 95°C por 15 min y 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 s), hibridación (65°C por 1 min) y elongación (72°C por 1 min). Por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 1 min. Como control negativo del ensayo se utilizó agua libre de nucleasas y como control positivo se utilizó la cepa de VDEN-3 116/2000 que contaba con cinco pases en la línea celular C6/36 HT.

2.3.5.2.2 Segunda reacción de la PCR anidada: serotipificación de los virus del dengue

La segunda reacción de la PCR anidada se realizó a partir del amplicón de 511 pares de bases (pb) obtenido en la RT-PCR (sección 2.3.5.2.1), los cebadores descritos por Lanciotti *et al.*, 1992⁽³⁴⁰⁾ (anexo 2.3) y el estuche comercial *Expand High Fidelity PCR System* (Roche, Alemania). Para su ejecución, se preparó una mezcla que contenía: tampón de reacción (2X), solución equimolar de dNTPs (200 µmol/L de cada uno), la enzima polimerizadora (1,5 U), agua libre de nucleasas y 1 µmol/L de los cebadores D1 (sentido) y TS1, TS2, TS3 y TS4 (anti-sentido) hasta completar 48 µL. Los cuatro cebadores anti-sentido se agregan a la mezcla e hibridan con la cadena de ADNc en dependencia del serotipo de VDENV que se amplifique (anexo 2.3). Posteriormente, se adicionaron 2 µL del producto de la primera reacción de la PCR anidada (sección 2.3.5.2.1) para un volumen final de 50 µL de mezcla. Se utilizaron, como controles negativo y positivo, 2 µL del producto de reacción correspondiente a dichos controles en la RT-PCR (sección 2.3.5.2.1).

La reacción se ejecutó en un termociclador QCylerII (Quanta Biotech, Reino Unido) que comenzó con una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min. Posteriormente se realizaron 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 30 s), hibridación (63°C por 1 min) y elongación (72°C por 1 min). Por último, se realizó un paso de elongación a 72°C por 5 min.

2.3.5.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para evidenciar la presencia del producto obtenido en la PCR anidada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 2 % en tampón TBE 1X (Tris 89mmol/L (Sigma-Aldrich), Ácido Bórico 89mmol/L (Sigma-Aldrich), EDTA 2mmol/L (Sigma-Aldrich) pH 8,3). Se utilizó bromuro de etidio 0,5 µg/mL (Sigma-Aldrich) para la visualización de las bandas. Se aplicaron, en cada pocillo, 5 µL del producto de la PCR y 2 µL de tampón de muestra y se realizó la corrida a 120 V y 400 mA durante 45 min. Al finalizar se utilizó un sistema de documentación de geles UVIsave D-55/20M (UVITEC, Inglaterra) para la visualización de las bandas. La identificación de los serotipos virales se realizó comparando las tallas de los productos obtenidos con un patrón preparado a partir productos de amplificación de los cuatro serotipos de dengue utilizando las cepas

virales: VDEN-1: 482 pb (61060, Venezuela/2006), VDEN-2: 119 pb (165/97, Cuba/1997), VDEN-3: 290 pb (116/00, Cuba/2000) y VDEN-4: 392 pb (61027, Venezuela/2006). Además, las tallas de los productos de la PCR anidada se verificaron con un marcador de peso molecular de ADN (100bp DNA *Ladder Molecular Weight Marker*, Promega) que se incluyó en cada gel como referencia.

2.3.5.2.4 Secuenciación nucleotídica de los amplicones obtenidos del gen *c-prm* de los virus del dengue

2.3.5.2.4.1 Preparación de los fragmentos de ADN para la secuenciación

La purificación del producto de reacción se realizó directamente de la solución resultante de la PCR anidada cuando el patrón de bandas de la electroforesis solo mostró la banda correspondiente a un serotipo de VDEN. En este caso, se empleó del estuche comercial *Qiaquick PCR purification Kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La verificación de la efectividad del proceso se realizó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% del ADN purificado según los procedimientos descritos en la sección 2.3.5.2.3.

Cuando el patrón de bandas de la electroforesis de la PCR anidada evidenció más de un amplicón, se procedió a la extracción y purificación del amplicón de interés a partir del gel de agarosa; para lo cual se utilizó el estuche comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Alemania), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se aplicó el producto de la PCR anidada restante en un gel de agarosa a 2%. Las bandas correspondientes a cada serotipo se cortaron de los geles, y cada fragmento de gel se colocó en tubos limpios y se pesó. Se añadieron 300 µL de tampón QG por cada 100 mg de peso. Cada tubo se incubó a 50°C en un baño termorregulado hasta disolver completamente la agarosa. Posteriormente se adicionó isopropanol (v/v) y se añadió la mezcla a una columna de purificación (suministrada por el fabricante). Se centrifugó a 15000xg por 1 min y se descartó el eluato. Se lavó la columna con 50 µL de tampón QG y se centrifugó nuevamente en las condiciones antes descritas. Nuevamente se eliminó el eluato y se realizó un segundo lavado con 750 µL de tampón PE, centrifugando en idénticas condiciones. El contenido de la columna se eluyó en 50 µL del tampón EB por centrifugación durante 1min. El ADN purificado se conservó a 4°C. Para verificar la

efectividad del proceso se realizó una electroforesis en gel de agarosa a 2% al ADN purificado, empleando los mismos procedimientos descritos en la sección 2.3.5.2.3.

2.3.5.2.4.2 Reacción de secuencia

La determinación de la secuencia nucleotídica de los productos de la PCR anidada se realizó empleando el principio del método de Sanger⁽³⁴¹⁾ con el uso de un estuche comercial (*CEQ DTCS quickstart kit*, Beckman Coulter). Para cada muestra se prepararon dos mezclas de reacción que contenían: 3 µL del ADN purificado, 8 µL de agua estéril, 8 µL de Master Mix (enzima, dNTPs, dideoxinucleótidos marcados y tampón de reacción) y un cebador (0,25 µmol/L) para 20 µL de volumen final. Una de las mezclas de cada muestra siempre contuvo el oligonucleótido D1 y el cebador de la otra mezcla (TS1, TS2, TS3 o TS4) dependió del serotipo identificado en la muestra (ver anexo 2.3 para más detalle). Posteriormente, se desarrolló la reacción en 30 ciclos de 96°C por 20 s, 55°C por 20 s y 60°C por 4 min, en un termociclador QCylerII (Quanta Biotech, Reino Unido).

2.3.5.2.4.3 Purificación del producto de la reacción de secuencia

La purificación de los productos de la reacción de secuencia se realizó mediante el método de precipitación con etanol ⁽³⁴²⁾. Para ello, se preparó un tubo estéril etiquetado para cada muestra, al cual se adicionaron 5 µL de la solución terminadora (2 µL de Acetato de Sodio 3 mol/L + 2 µL EDTA 100 mM + 1 µL de glucógeno 20 mg/mL). La solución anterior se mezcló con 20 µL de la reacción de secuencia y 60 µL de etanol absoluto. Esta mezcla se centrifugó a 15000xg por 25 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con 200 µL de etanol 70% (v/v). En cada paso de lavado se centrifugó a 15000xg a 4°C, por 2 min. Después de descartar el sobrenadante cuidadosamente, se dejó secar el precipitado y se resuspendió en 40 µL de formamida (99%) empleando el vórtex.

Los productos purificados de la reacción de secuencia se transfirieron a las placas del secuenciador automático de electroforesis capilar CEQ 8800 (Beckman Coulter, EUA). Las secuencias y sus cromatogramas correspondientes se procesaron en el programa Sequencher 4.8 (Gene Codes Corporation, EUA). Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con otras secuencias de VDENVs disponibles en GenBank, a través de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.3.5.3 Detección y secuenciación del virus Zika en grupos de *Aedes aegypti*

2.3.5.3.1 PCR en tiempo real: detección del genoma viral de Zika

Un fragmento del gen *ns5* del genoma viral se amplificó a través de una RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), según el protocolo descrito por Lanciotti *et al.*, 2008⁽³⁴³⁾. La RT-qPCR consistió en una transcripción reversa en un solo paso, seguida de 45 ciclos de amplificación. Se utilizó el termociclador LightCycler 96 (Roche, Suiza) y el estuche comercial *SuperScript III Platinum One Step qRT-PCR* (Invitrogen, Alemania) para la reacción de amplificación, según recomienda el fabricante. Se preparó, para cada grupo, una mezcla que contenía: 12,5 µL de tampón de reacción (2X), 0,25 µL de los cebadores VZIK 1086 (sentido: 5'- CCGCTGCCCAACACAAG-3') y VZIK 1162c (antisentido: 5'- CCACTAACGTTCTTTTGAGACAT -3') a una concentración final de 1 µmol/L; 0,0625 µL de la sonda ([6~FAM] AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA [BHQ1a~Q]) a una concentración final de 0,25 µmol/L; 0,5 µL de la mezcla de enzimas (1X) y agua libre de nucleasas hasta completar 15 µL de volumen final. Posteriormente, se adicionaron 10 µL del ARN extraído (sección 2.3.5.1) para un volumen final de reacción de 25 µL. El perfil térmico de la reacción fue el siguiente: 30 min de transcripción reversa a 50°C, seguido de 2 min a 95°C para la inactivación de la retrotranscriptasa y la activación de la polimerasa ADN y 45 ciclos a 95°C por 15 seg seguido de 1 min a 60°C. Como control positivo se empleó el ARN extraído (siguiendo los procedimientos descritos en sección 2.3.5.1) de un grupo de cinco *Ae. aegypti* infectados artificialmente con la cepa VZIK_Guadeloupe. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

2.3.5.3.2 Secuenciación nucleotídica del virus Zika

Los ARN de las muestras que resultaron positivas a VZIK con un valor de Ct ≤ 33, fueron enviados en condiciones refrigeradas a la Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207), en Marsella, Francia, a partir de la colaboración existente con el Instituto Pasteur de Guadalupe. Las muestras fueron sometidas a secuenciación nucleotídica de tercera generación empleando la tecnología *S5 Ion torrent* tal como se describe brevemente a continuación.

2.3.5.3.2.1 Amplificación viral

Una RT-PCR en un solo paso amplificó 12 fragmentos superpuestos de todo el genoma viral empleando 12 juegos de cebadores (anexo 2.4). La reacción se llevó a cabo

utilizando el estuche comercial *SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System* (Thermo Fisher) (12,5 µL del tampón de reacción *Platinum™ SuperFi™ RT-PCR 2X* y 0,5 µL de la mezcla de enzimas *SuperScript™ IV RT*), 3 µL de ARN y 500 nM de cada cebador en un volumen final de 25 µL. El perfil térmico constó de 2 min a 50°C para la transcripción reversa seguido de 2 min a 98°C y 40 ciclos que incluyeron una desnaturalización por 10 seg a 98°C, una hibridación por 10 seg a 56°C, y una elongación por 2 min 30 seg a 68°C. Se finalizó con un paso de elongación final de 5 min a 68°C. Los productos de PCR se agruparon en proporciones equimolares después de su purificación mediante el estuche comercial *Nucleofast PCR Plate* (Macherey Nagel).

2.3.5.3.2.2 Secuenciación viral

Una vez cuantificados (con el estuche comercial *Qubit® dsDNA HS Assay* y el equipo *Qubit 4.0 fluorometer* (ThermoFisher)) los amplicones se sonicaron para obtener fragmentos de 250 pb. Las bibliotecas del ADNc de cada muestra se construyeron añadiendo un “código de barras” constituido por secuencias de ADN para la identificación de la muestra y cebadores, usando el estuche comercial *Ion Plus Fragment Library Kit* y el sistema *AB Library Builder* (ThermoFisher). Con el fin de agrupar equimolarmente las muestras marcadas con su “código de barras”, se realizó un paso de cuantificación en PCR a tiempo real empleando el estuche comercial *Ion Library TaqMan™ Quantitation* (ThermoFisher). Los pasos siguientes incluyeron una PCR en emulsión de las muestras agrupadas y su carga en el chip 530, usando el equipo automático *Ion Chef* (ThermoFisher), que continuó con su secuenciación empleando la tecnología *S5 Ion torrent* (ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La secuencia consenso se obtuvo tras la edición de las lecturas (las lecturas con una puntuación de calidad <0,99 y de longitud <100pb fueron eliminadas, así como los 30 primeros y últimos nucleótidos de cada lectura) y su mapeo sobre una secuencia de referencia, usando el programa *CLC genomics workbench v.22.0.1* (Qiagen). Los parámetros para el ensamblaje basado en referencias consistieron en: puntuación de coincidencia = 1; costo de desajuste = 2; fracción de longitud = 0,5; fracción de similitud = 0,8; costo de inserción = 3 y costo de delección = 3. También se produjo un cóntigo (del inglés *contig*) *de novo* para asegurar que la secuencia consenso no se afectara por la secuencia de referencia.

2.3.5.4 Cálculo de la proporción de los virus del dengue y Zika

Se calculó la proporción de los virus detectados (cantidad de veces que apareció un virus/sumatoria de la cantidad de veces que aparecieron todos los virus) en los grupos de *Ae. aegypti* examinados durante los períodos de estudio para cada área de salud y el municipio Arroyo Naranjo, y los valores se expresaron en por ciento.

2.3.5.5 Cálculo de la frecuencia de aparición de los virus del dengue y Zika

Se calculó la frecuencia de aparición de los VDENS y VZIK en los grupos de *Ae. aegypti* examinados en cada área de salud durante los períodos de estudio, así como la frecuencia de aparición de cada virus en el municipio Arroyo Naranjo según:

$$fx(T) = \frac{MPx(T)}{MI(T)} \quad \text{[Fórmula 2.1]}$$

donde $fx(T)$ es la frecuencia de aparición del virus x en el territorio T , $MPx(T)$ es la cantidad de meses en que apareció x en el territorio T y $MI(T)$ es la cantidad de meses en que se analizaron muestras entomológicas del territorio T .

2.3.5.6 Cálculo de las tasas de infección mínima de los virus del dengue y Zika

Se calcularon las tasas de infección mínima (TIM)⁽³⁴⁴⁾ por mes para cada área de salud según:

$$TIM = \frac{\text{No. de grupos positivos}}{\text{total de mosquitos analizados}} * 1000 \quad \text{[Fórmula 2.2]}$$

Los análisis estadísticos para la comparación de las TIM se realizaron en R v.3.3.2⁽³⁴⁵⁾. Para cada virus (VDENS y VZIK), se compararon las TIM globales entre áreas de salud durante el periodo 2018-2019. Las comparaciones fueron realizadas siguiendo la distribución de Poisson. Las varianzas de las tasas se calcularon con intervalos de confianzas de 95% de una proporción binomial. Todas las comparaciones con valores de $P > 0,05$ se consideraron no significativas.

2.3.5.7 Construcción de mapas de distribución espacio-temporal de los virus del dengue y Zika

Los sitios de aparición de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* infectados con algún virus fueron cartografiados a partir de los datos de geo-referenciación obtenidos para cada muestra mediante el Sistema de Información Geográfica MapInfo v.11.0⁽³³⁶⁾. Se

construyeron mapas de distribución en los territorios muestreados para todos los meses del estudio por medio del programa MapInfo v.11.0⁽³³⁶⁾.

2.4 Estudios de transmisión de arbovirus en condiciones de laboratorio

2.4.1 Poblaciones de *Aedes aegypti* estudiadas

Los estudios de laboratorio se realizaron con la generación F1 de dos poblaciones de mosquitos colectadas en las áreas de salud Pasteur (PTE) del municipio Diez de Octubre y Párraga (PRG) del municipio Arroyo Naranjo, ambas en La Habana, como se describe en la sección 2.3.3.

Los huevos de cada población colectados en el terreno se sumergieron en agua declorada en bandejas con un área de 400 cm² y las larvas fueron criadas bajo condiciones controladas de temperatura (28°±1°C), humedad relativa (80%) y ciclo de luz/oscuridad (12h:12h) a una densidad de 150-200 larvas/litro de agua. A cada recipiente se le añadió una tableta de comida para conejo (GMA, Guadalupe) cada 3-4 días para la alimentación. Los mosquitos adultos recién emergidos fueron transferidos en razón de 7 hembras: 1 macho a jaulas de 3375 cm³, con solución de sacarosa al 10% y se les permitió la cópula por 48h. Los mosquitos adultos fueron mantenidos en las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa y ciclo de luz/oscuridad antes descritas. Para obtener los huevos de la generación F1, se les suministró sangre de carnero empleando el sistema Hemotek (Hemotek Ltd., Blackburn, Reino Unido) y un recipiente con agua y una tira de papel en la cara interna, debidamente identificada, para la ovipuesta. Pasadas 96h, se retiró el recipiente de ovipuesta y se favoreció el desarrollo embrionario de los huevos colectados como se describió en la sección 2.3.3. Después del tercer ciclo gonadotrófico, los parentales fueron sacrificados, agrupados y sometidos al procesamiento descrito en la sección 2.3.5.1 para verificar la ausencia de infección arboviral por VDENV y VZIK. El ARN extraído de los grupos de parentales (10 µL) fue evaluado empleando los estuches comerciales Lightmix Modular Zika (Roche, Panamá) and Lightmix Modular Dengue (Roche, Panamá) mediante RT-qPCR en el equipo *Applied Biosystems 7500 real-time PCR system* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los huevos F1 provenientes de parentales

negativos a VDENs y VZIK fueron empleados en los ulteriores ensayos de competencia vectorial (sección 2.4.4) y transmisión vertical (sección 2.4.5). Posterior a su embriogénesis, las tiras de papel conteniendo estos huevos se conservaron en bolsas plásticas, las cuales se exportaron en condiciones de humedad y temperatura ambiente a Guadalupe, Francia.

Los huevos de la F1 de las poblaciones PTE y PRG se pusieron a eclosionar y las larvas a criar en las mismas condiciones descritas anteriormente. Una vez emergidos, los adultos se mantuvieron en jaulas de 30 x 30 x 30 cm, con solución de sacarosa al 10% bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad relativa y ciclo de luz/oscuridad. Las hembras de siete a diez días de nacidas de cada población se emplearon en los ensayos de competencia vectorial (sección 2.4.4) y transmisión vertical (sección 2.4.5).

2.4.2 Cultivos celulares

La línea celular C6/36 (células de *Ae. albopictus*) clono <30 (Institut Pasteur, Paris), fue empleada en la generación de los lotes virales de VDEN-1, así como para la titulación y amplificación de las muestras obtenidas durante la experimentación, provenientes de hembras expuestas a ese virus. Las células se crecieron a 28°C en frascos plásticos estériles de 75 cm³ (Dutscher), utilizando medio Leibovitz 15 (L-15) (Gibco, Fisher Scientific) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina. Las monocapas confluentes se pasaron semanalmente a una razón de pase 1:8. Para la realización de las de las titulaciones de los virus y muestras, se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 6×10^5 células/mL.

La línea celular Vero (células de riñón de mono verde africano) clono <30 (ATCC, ref. CCL- 81), fue empleada en la generación de los lotes virales de VCHIK y VZIK, así como en la titulación y amplificación de las muestras obtenidas durante la experimentación, provenientes de hembras expuestas a esos virus. Las células se crecieron a 37°C y en ambiente de CO₂ 5% en frascos plásticos estériles de 75 cm³ (Dutscher), utilizando medio DMEM (Gibco, Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina-estreptomicina. Las monocapas confluentes se pasaron semanalmente a una razón de pase 1:10. Para la realización de las titulaciones de los

virus y muestras, se prepararon suspensiones celulares a una concentración de $4,8 \times 10^5$ células/mL.

2.4.3 Cepas de los virus dengue-1, chikungunya y Zika ensayadas

Se emplearon cepas de los virus VDEN-1, VCHIK y VZIK (tabla 2.1) aisladas del suero de pacientes en Guadalupe (en el caso de las cepas de VDEN-1, VCHIK y VZIK-Guadalupe) o proporcionada por la Unidad de Virus Emergentes (Marsella, Francia) vía la iniciativa “European Virus Archive goes global” (EVAg) (en el caso de la cepa VZIK-Dak84).

2.4.3.1 Generación de los lotes virales de dengue-1

Frascos plásticos estériles de 75 cm² con monocapa sub-confluente de células C6/36 fueron inoculados con 1 mL de la dilución de la cepa viral (tabla 2.1) con MOI de 0,1; empleando medio de mantenimiento suplementado con SFB 2% para la dilución viral. Las células inoculadas se incubaron durante 1h a 28°C. Pasado ese tiempo, se descartó el inóculo y se añadieron 10 mL de medio de mantenimiento suplementado con SFB 2% a cada uno de los frascos. Los cultivos infectados con VDEN-1 fueron incubados a 28°C por cinco días. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las células y su medio a 200 000xg por 5 min, 4°C. Posteriormente se colectó el sobrenadante y se le añadió SFB hasta completar el 10% de su concentración en el medio. La suspensión viral se distribuyó en alícuotas de 1mL debidamente rotuladas que se conservaron a -80°C.

2.4.3.2 Generación de los lotes virales de chikungunya y Zika

Frascos plásticos estériles de 75 cm³ con monocapa sub-confluente de células Vero fueron inoculados con 1 mL de la dilución de las cepas virales (tabla 2.1). Todas las cepas fueron inoculadas con multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0,1; empleando medio de mantenimiento suplementado con SFB 2% para la dilución viral. Las células inoculadas se incubaron durante 1h a 37°C en ambiente de CO₂ 5%. Pasado ese tiempo, se descartó el inóculo y se añadieron 10 mL de medio de mantenimiento suplementado con SFB 2% a cada uno de los frascos. Los cultivos infectados con VZIK fueron incubados a 37°C en ambiente de CO₂ 5% por siete días, mientras que los infectados con VCHIK se incubaron por tres días. Pasado ese tiempo, se procedió de la misma manera descrita en la sección 2.4.3.1 para la colecta y conservación de las suspensiones virales.

2.4.3.3 Titulación del lote viral de dengue-1 utilizando el método de inmuno-fluorescencia indirecta

Se prepararon diluciones seriadas en base 10 del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-12} . Se inocularon 50 μ L de cada dilución viral (con cinco réplicas de cada una) sobre monocapas confluentes de células C6/36 en una placa de 96 pozos y se incubaron a 28°C por 2 h. Posteriormente se retiró el inóculo y se añadieron 140 μ L de una solución de recubrimiento (carboximetilcelulosa:L-15 2X suplementado con SFB (4%) y antibiótico-antimicótico 1X (2%) (Anti-Anti; Gibco, Fisher Scientific) v:v), que se incubó por cinco días a 28°C. Pasado ese tiempo, se añadieron 140 μ L de formaldehído 3,6% y se incubó por 30 min. Posteriormente, se descartó todo el volumen de cada pozo y se lavaron tres veces con 100 μ L de tampón fosfato-salino 1X (PBS-1X). Luego, se añadieron 100 μ L de Tritón 0,5% diluido en PBS 1X que se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS 1X, se añadieron 50 μ L de una dilución 1:200 de líquido ascítico hiperinmune anti-VDENs como anticuerpo primario (Merk) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Después de otros tres pasos de lavado con PBS 1X, se adicionaron 50 μ L de una IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 diluido 1:500 (Life Technologies, Carlsbad, EUA) como anticuerpo secundario que fue incubado por 45 min a 37°C. Para finalizar, se realizaron los últimos tres lavados con 100 μ L de PBS 1X.

Cada pozo se observó al microscopio de fluorescencia para visualizar los focos fluorescentes. El título viral fue expresado en Unidades Formadoras de Foco (uff/mL) y se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Título viral} = \frac{\text{No. de focos} * \text{dilución} * 1000}{\text{Volumen del inóculo}} \quad [\text{Fórmula 2.3}]$$

2.4.3.4 Titulación de los lotes virales de chikungunya y Zika utilizando el método TCID₅₀

Se prepararon diluciones seriadas en base 10 de los virus desde 10^{-1} hasta 10^{-7} .

Tabla 2.1 Características de las cepas virales de dengue-1, chikungunya y Zika empleadas en los ensayos experimentales de competencia vectorial y transmisión vertical de las poblaciones de *Aedes aegypti* PTE y PRG.

Cepa viral	Origen/ Genotipo	Año del primer aislamiento/ Lugar/ hospedero	Historial de pases del banco de virus	Tipo celular empleado en los pases virales	Número de acceso al GenBank	Ensayo en el que se empleó
VDEN-1	Americano (genotipo V)	2013/Guadalupe/humano	P2	Células de <i>Aedes albopictus</i> , C6/36	OR486055 (genoma completo)	Competencia vectorial y transmisión vertical
VCHIK	Americano (asiático)	2014/Guadalupe/humano	P2	Células de riñón de mono verde africano, Vero (ATCC, ref. CCL-81)	OR488122 (genoma completo)	Competencia vectorial y transmisión vertical
VZIK-Guadalupe	Americano (asiático)	2016/Guadalupe/humano	P2	Células de riñón de mono verde africano, Vero (ATCC, ref. CCL-81)	PP470595	Competencia vectorial
VZIK - Dak84	Africano (africano)	1984/Senegal/ <i>Aedes taylori</i>	P5	Células de riñón de mono verde africano, Vero (ATCC, ref. CCL-81)	KU955592 (genoma completo)	Trasmisión vertical

Se inocularon 100 uL de cada dilución viral (con ocho réplicas de cada una) sobre monocapas confluentes de células Vero en una placa de 96 pozos y se incubaron a 37°C en ambiente de CO₂ 5%, por siete días para VZIK y tres días para VCHIK. Pasado ese tiempo, se retiró el medio y la monocapa se tiñó con 100 µL de una solución de cristal violeta (0,2% en 10% formaldehído y 20% etanol). Después de 30 min se lavó la placa con agua corriente. El efecto citopático constituyó la evidencia de la presencia de partículas virales. El título viral fue estimado en dosis media infecciosa en cultivo de tejidos por mL (TCID₅₀/mL por sus siglas en inglés) para VCHIK y VZIK, y se calculó empleando el algoritmo de Spearman y Kärber descrito en⁽³⁴⁶⁾.

2.4.4 Ensayos de competencia vectorial

La competencia vectorial de las poblaciones PTE y PRG fue evaluada en el laboratorio modular de seguridad nivel 3 (BSL3, por sus siglas en inglés) del Instituto Pasteur de Guadalupe, Francia, siguiendo una adaptación del protocolo publicado por⁽²⁸⁹⁾. Para cada población de *Ae. aegypti*, 60 hembras de 7-10 días de nacidas fueron introducidas en contenedores plásticos de fondo movable y se les privó de alimento durante 24h. Pasado ese tiempo, empleando el sistema de alimentación artificial Hemotek (Hemotek Ltd., Blackburn, Reino Unido), se les ofreció una mezcla infecciosa que contenía 1,4 mL de eritrocitos humanos previamente lavados con PBS-1X; 0,7 mL de la suspensión viral (VDEN-1, VCHIK o VZIK) a un título final de 10⁷ TCID₅₀/mL (en el caso de VCHIK y VZIK) y 10⁷ UFF/mL (en el caso de VDEN-1) y ATP 5 mM (Sigma-Aldrich). Las cápsulas contenedoras de la mezcla infecciosa del sistema Hemotek recubiertas de membranas de intestino de cerdo se mantuvieron a 37°C y se ofrecieron a los mosquitos durante 1h en condiciones controladas de temperatura (28°±1°C) y humedad relativa (80%). Pasado este tiempo las hembras fueron anestesiadas en frío y las que estuvieron totalmente alimentadas se transfirieron a contenedores cilíndricos de cartón de 1500 cm³. Durante el período post exposición, las hembras fueron alimentadas con solución de sacarosa (10%) e incubadas en una cámara climática (Memmert, Schwabach, Alemania) bajo las condiciones de temperatura, humedad relativa y ciclo de luz/oscuridad descritas previamente.

Pasado los días post-exposición (dpe) determinados para cada virus (tres, siete y 14 para VCHIK, y siete y 14 para VDEN-1 y VZIK), los mosquitos fueron anestesiados en frío y

transferidos individualmente a una placa Petri. De cada hembra se colectó la saliva utilizando el método de salivación forzada descrito por Dubrulle *et al.*, 2009⁽²⁹¹⁾ con algunas modificaciones: se extirparon las patas y alas de cada individuo y se introdujo la proboscis en una punta de pipeta de 20 µL que contenía 5 µL de SFB donde la hembra excretó la saliva. Pasados 30 min, el contenido de la punta se depositó en un tubo Eppendorf de 0,5 mL con 45 µL de medio de cultivo DMEM/L-15 (en el caso de mosquitos expuestos a VCHIK y VZIK/en el caso de mosquitos expuestos a VDEN-1, respectivamente). Además, se disecó la cabeza de cada hembra, de manera que cada mosquito generó tres muestras: tórax-abdomen, cabeza y saliva. Apropriadamente rotulada, cada muestra se conservó a -80°C para su ulterior procesamiento.

Los tórax-abdomen y cabezas fueron independientemente homogenizadas en 300 µL de DMEM/L-15 suplementado con SFB 2% y 1% de antibiótico-antimicótico (Anti-Anti; Gibco, Fisher Scientific) en un homogenizador automático (Benchmark Scientific, Estados Unidos) durante 30 seg a 60 Hz. Cada homogenado fue centrifugado a 10 000xg por 5 min a 4°C, y los sobrenadantes conservados a -80°C hasta su titulación.

2.4.4.1 Titulación mediante ensayos de inmuno-fluorescencia en células C6/36 de muestras de tórax-abdomen, cabezas y salivas

Las muestras provenientes de mosquitos expuestos a VDEN-1 se titularon mediante ensayos de inmuno-fluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés) en la línea celular C6/36, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 2.4.3.3. La única modificación realizada a este protocolo consistió en que las muestras fueron diluidas 1:1,25 y 1:5, y tituladas por duplicado. El título viral fue expresado en Unidades Formadoras de Foco (uff/saliva) y se calculó utilizando la fórmula 2.4.

$$\text{Título viral} = \frac{\text{No. de focos} * \text{dilución}}{\text{volumen del inóculo}} * \text{volumen total de la muestra} \quad [\text{Fórmula 2.4}]$$

2.4.4.2 Titulación por determinación de efecto citopático en células Vero

2.4.4.2.1 Titulación de muestras de tórax-abdomen y cabezas

Diluciones seriadas en base 10 de las muestras de tórax-abdomen y cabeza provenientes de mosquitos expuestos a VZIK y VCHIK se titularon siguiendo los procedimientos

descritos en la sección 2.4.3.4 y empleando tres réplicas de cada muestra. El efecto citopático en la monocapa constituyó la evidencia de la presencia de partículas virales (anexo 2.5).

2.4.4.2.2 Titulación de muestras de saliva

Monocapas de células en placas de 6 pozos se inocularon con 300 μ L de diluciones seriadas de las muestras de saliva por duplicado e incubadas por 1 hora a 37°C y CO₂ 5%. Pasado ese tiempo, se añadieron 4 mL de una solución de recubrimiento (solución de agarosa 2%: DMEM 2X suplementado con SFB (4%) y antibiótico-antimicótico 1X (2%) (Anti-Anti; Gibco, Fisher Scientific) v:v) y se incubaron por el tiempo y bajo las condiciones descritas en la sección 2.4.3.4. Pasado ese tiempo, la solución de recubrimiento fue retirada y se añadieron 300 μ L de una solución de cristal violeta (0,2% en 10% formaldehído y 20% etanol) en cada pozo. Después de 30 min la solución de cristal violeta se descartó y la placa se lavó con agua corriente. Se contaron el número de placas en cada pozo y se calculó el título viral que se expresó en Unidades Formadoras de Placas (ufp/saliva) utilizando la fórmula 2.4.

2.4.4.3 Estimación de los parámetros de competencia vectorial

Los parámetros de competencia vectorial reflejan los niveles de permisividad a un virus de una población de vectores en estudio⁽³⁴⁷⁾. En nuestros experimentos, evaluamos principalmente los siguientes parámetros:

- Tasa de infección (TI): corresponde a la proporción de hembras con el tórax-abdomen infectado entre el total de las hembras examinadas.
- Tasa de diseminación (TD): expresa la proporción de hembras con cabezas infectadas entre el total de hembras examinadas.
- Tasa de transmisión (TT): refleja la proporción de hembras que presentaron saliva infectada entre el total de hembras examinadas.

2.4.5 Ensayos de transmisión vertical

Los ensayos de transmisión vertical comparten varios pasos con los ensayos de competencia vectorial, aunque su objetivo consiste en caracterizar la transmisión vertical de un patógeno en la población de un vector en estudio, fundamentalmente mediante la estimación de la frecuencia con que las madres transfieren un patógeno determinado a

su descendencia y la proporción de descendientes que resultan infectados con cada evento de transmisión vertical.

Los ensayos de transmisión vertical se desarrollaron empleando las mismas poblaciones de *Ae. aegypti* (PTE y PRG), obtenidas como se describió en la sección 2.4.1. Siguiendo la metodología detallada en la sección 2.4.4, las hembras de cada población se expusieron a los virus (VDEN-1, VCHIK o VZIK) (tabla 2.1) y luego de anestesarlas en frío, aquellas que estuvieron totalmente alimentadas, fueron transferidas individualmente a tubos plásticos de 50 mL adaptados para la oviposición (papel de filtro recubriendo algodón húmedo en el fondo del tubo) y la alimentación (abertura superior del tubo cubierta de mosquitero) (figura 2.3). Durante el período post exposición, las hembras fueron alimentadas con solución de sacarosa (10%) e incubadas en una cámara climática (Memmert, Schwabach, Alemania) bajo las condiciones controladas de temperatura ($28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (80%) y ciclo de luz/oscuridad (12h:12h).

Pasados seis a 10 días post exposición, se recogieron los huevos puestos por cada hembra en el primer ciclo gonadotrófico (1^{er}CG), los cuales fueron sometidos a condiciones de temperatura ($28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad (80%) controladas para favorecer la embriogénesis. Entre el oncenso y el decimotercer dpe, a las madres se les ofreció una segunda alimentación sanguínea no infecciosa (que contenía 2,1 mL de eritrocitos humanos previamente lavados y resuspendidos en PBS-1X con albúmina de suero bovino (BSA) al 20% y ATP 5 mM (Sigma-Aldrich)), empleando el sistema de alimentación artificial Hemotek (Hemotek Ltd., Blackburn, Reino Unido) tal como se describió en la sección 2.4.4. Un nuevo sustrato de oviposición fue colocado en cada tubo para recuperar los huevos del segundo ciclo gonadotrófico (2^{do}CG) que fueron sometidos al procedimiento de embriogénesis anteriormente descrito.

Las madres se conservaron en 300 μL de DMEM/L-15 (DMEM para las expuestas a VCHIK o VZIK y L-15 para las expuestas a VDEN-1) suplementado con SFB (2%) y antibiótico-antimicótico 1X (1%) (Anti-Anti; Gibco, Fisher Scientific) a -80°C hasta su procesamiento.

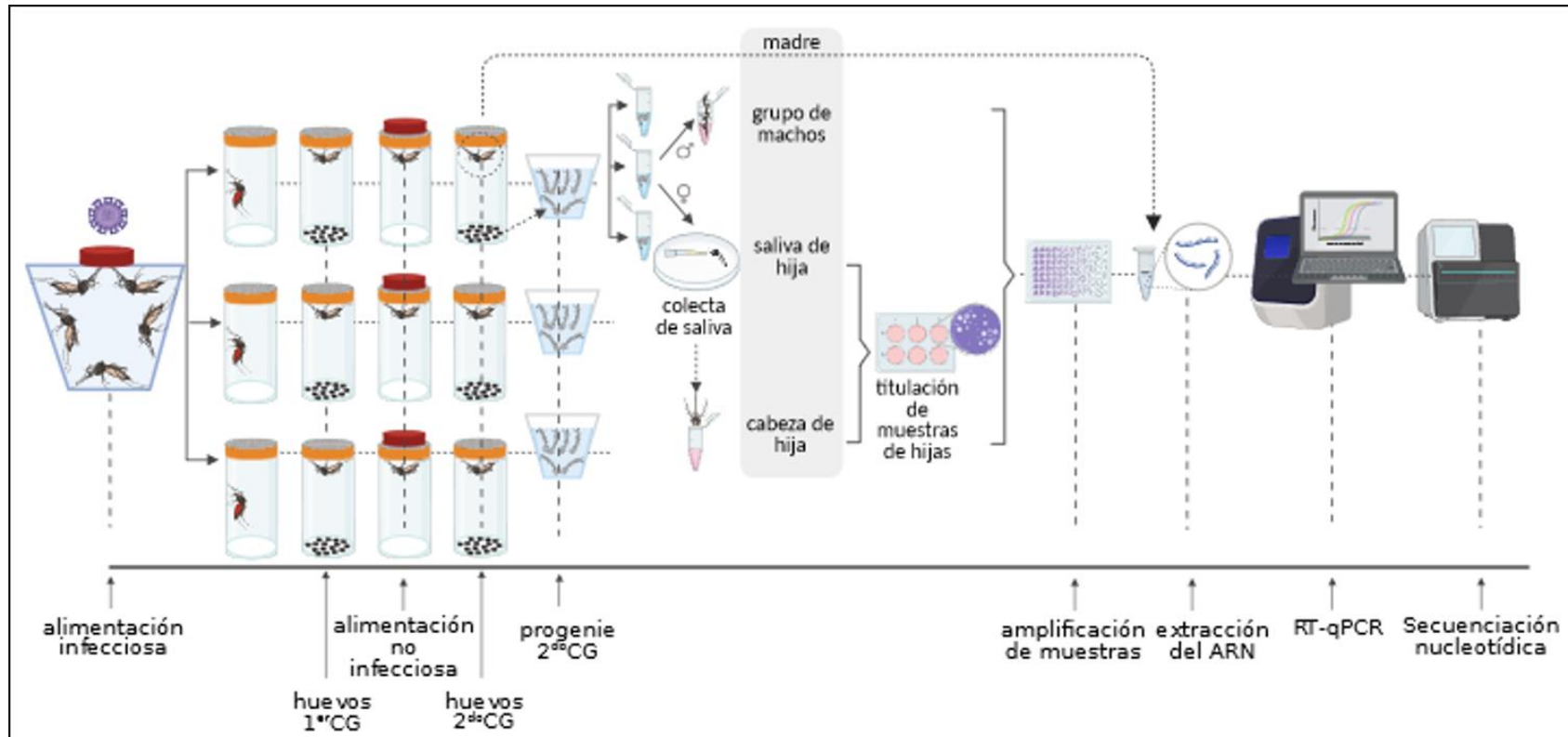


Figura 2.3 Flujo de trabajo para los ensayos de transmisión vertical desarrollados con las poblaciones de *Aedes aegypti* PTE y PRG frente a los virus dengue-1, chikungunya y Zika. Solo se especifica el tratamiento dado a la progenie del 2º ciclo gonadotrófico (2ºCG). La descendencia del 1ºCG fue puesta igualmente a eclosionar y las larvas de 4º estadio/pupa se reunieron en grupos de hasta 10 individuos que siguieron el mismo procedimiento desde el paso de amplificación de las muestras en adelante.

Las larvas fueron alimentadas con tabletas de comida para conejos (GMA, Guadalupe) diariamente a una concentración de 0,4 mg/larva. La descendencia del 1^{er}CG se analizó de manera diferente a la del 2^{do}CG.

Una vez que alcanzaron el estadio L4-pupa, los individuos provenientes de la misma madre en el 1^{er}CG, fueron agrupados en conjuntos de hasta diez especímenes, los cuales fueron conservados en 300 µL de DMEM/L-15 (DMEM para la descendencia de madres expuestas a VCHIK/VZIK y L-15 para las expuestas a VDEN-1) suplementado con SFB (2%) y antibiótico-antimicótico 1X (1%) (Anti-Anti; Gibco, Fisher Scientific) a -80°C hasta su procesamiento.

La progenie del 2^{do}CG, una vez que llegó al estadio pupal, fue separada individualmente. Los machos adultos provenientes de una misma madre se agruparon en conjuntos de hasta diez individuos y se conservaron en las mismas condiciones que la progenie del 1^{er}CG. Las hembras adultas fueron forzadas a salivar empleando la metodología detallada en la sección 2.4.4. Adicionalmente se disecó la cabeza de cada hembra que fue transferida a 300 µL de DMEM/L-15 (DMEM para la descendencia de madres expuestas a VCHIK/VZIK y L-15 para las expuestas a VDEN-1) suplementado con SFB (2%) y antibiótico-antimicótico 1X (1%) (Anti-Anti; Gibco, Fisher Scientific) y conservada a -80°C hasta su procesamiento (figura 2.3).

Las muestras de saliva de las hembras adultas del 2^{do}CG y de cabeza de hijas provenientes de madres expuestas a VDEN-1, fueron tituladas siguiendo los procedimientos descritos en las secciones 2.4.4.1 y 2.4.4.2. El título viral se estimó empleando la fórmula 2.4, y fue expresado en ufp/saliva para las salivas positivas a VCHIK y VZIK, y en uff/saliva para las salivas positivas a VDEN-1 (figura 2.3).

Las madres expuestas por vía oral a los diferentes arbovirus, así como las muestras generadas a partir de la progenie en cada ciclo gonadotrófico (grupos de larvas/pupas del 1^{er}CG, grupos de machos adultos del 2^{do}CG y cabezas de hembras adultas del 2^{do}CG) fueron homogenizadas siguiendo los procedimientos detallados en la sección 2.4.4 (figura 2.3).

2.4.5.1 Amplificación viral en cultivos celulares

Los sobrenadantes de homogenados de los grupos de larvas/pupas del 1^{er}CG, grupos de machos adultos del 2^{do}CG, salivas de hembras adultas del 2^{do}CG y cabezas de hembras

adultas del 2^{do}CG provenientes de madres expuestas a VDEN-1, se inocularon en monocapas de células Vero o C6/36 (en dependencia del virus a que haya estado expuesta la madre) en placas de 96 pozos. Las células Vero inoculadas con muestras provenientes de madres expuestas a VCHIK se incubaron a 37°C y CO₂ (5%) durante tres días, mientras que las muestras provenientes de madres expuestas a VZIK se incubaron en las mismas condiciones durante siete días. Por su parte, las células C6/36 inoculadas con muestras provenientes de madres expuestas a VDEN-1, se incubaron por cinco días a 28°C. Pasados esos tiempos, los sobrenadantes celulares fueron retirados y conservados debidamente rotulados a -80°C. Las monocapas de células Vero se tiñeron con 100 µL de violeta cristal (0,2% en 10% formaldehído y 20% etanol), mientras que a las células C6/36 se les añadió 100 µL de formaldehído 3,6% y se incubaron por 30 min. Se chequeó el ECP en las monocapas de células Vero.

2.4.5.2 Extracción de ARN de sobrenadantes celulares

La extracción del ARN se efectuó a partir del sobrenadante de homogenado de madres expuestas a los tres virus, así como de los sobrenadantes celulares obtenidos de la amplificación en células (sección 2.4.5.1) de los grupos de larvas/pupas del 1^{er}CG, grupos de machos adultos del 2^{do}CG, salivas de hembras adultas del 2^{do}CG y cabezas de hembras adultas del 2^{do}CG provenientes de madres expuestas a VDEN-1. Para ello se utilizó el estuche comercial *Nucleospin RNA* (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania) y 100 µL de cada muestra, y se procedió según las indicaciones del fabricante. El ARN obtenido se conservó a -80°C hasta su posterior uso.

2.4.5.3 Detección de genoma viral en muestras de los ensayos de transmisión vertical

A través de una RT-qPCR se detectó el genoma viral en las muestras de madres expuestas a cada uno de los tres virus, grupos de larvas/pupas del 1^{er}CG, grupos de machos adultos del 2^{do}CG, salivas de hembras adultas del 2^{do}CG y cabezas de hembras adultas del 2^{do}CG provenientes de madres expuestas a VDEN-1. Los tres protocolos de RT-qPCR (para detectar VDEN-1, VCHIK y VZIK) usaron los mismos reactivos (excepto por los cebadores y sondas que fueron específicos para cada virus) y siguieron el mismo perfil térmico.

La RT-qPCR consistió en una transcripción reversa seguida de 45 ciclos de amplificación, en un solo paso, en el termociclador *Applied Biosystems 7500 real-time PCR system*

(Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). Para la reacción de amplificación se usó el estuche comercial *Superscript® III Platinum® One-step qRT-PCR* (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), según recomienda el fabricante. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μL y contenía 12,5 μL de tampón de reacción (2X), los cebadores sentido y antisentido a una concentración final de 0,2 $\mu\text{mol/L}$ cada uno; la sonda a una concentración final de 0,1 $\mu\text{mol/L}$; 0,5 μL de la mezcla de enzimas (1X) y agua libre de nucleasas hasta completar 20 μL . Posteriormente, se adicionaron 5 μL del ARN extraído (sección 2.4.5.2). El perfil térmico de la reacción fue el siguiente: 30 min de transcripción reversa a 50°C, seguido de 2 min a 95°C para la inactivación de la transcriptasa reversa y la activación de la polimerasa ADN, seguido por 45 ciclos a 95°C por 15 seg y 31 seg a 58°C. Como control positivo se empleó el ARN extraído de hembras de mosquitos artificialmente infectadas con cada uno de los tres virus y que habían resultado positivas por titulación. Como control negativo se empleó agua libre de nucleasas.

El conjunto de cebadores/sonda específicos *group forward* y *group reverse/Probe 1 Den-1-3* diseñados por Callahan *et al.*, 2001⁽³⁴⁸⁾, se usaron para amplificar un fragmento de la región 3'UTR de VDEN-1. En el caso de VCHIK, el gen diana para la amplificación fue *nsp1*, a partir de los cebadores ChikSI y ChikAsI, y la sonda ChikP previamente diseñados por Panning *et al.*, 2008⁽³⁴⁹⁾. Por último, un fragmento del gen *ns5* de VZIK fue amplificado por los cebadores/sonda específicos VZIK 1086, VZIK 1162c/ VZIK 1107, publicados previamente por Lanciotti *et al.*, 2008⁽³⁴³⁾ (sección 2.3.5.3.1).

En cada caso, las muestras examinadas se consideraron positivas si tuvieron un valor de ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés) menor o igual a 39 para VDEN-1; 34 para VCHIK y 35 para VZIK. Estos valores de Ct fueron seleccionados en base a curvas estándar de partículas infecciosas-genomas realizadas con anterioridad en el laboratorio empleando los mismos virus.

2.4.5.4 Secuenciación nucleotídica de las muestras positivas de los ensayos de transmisión vertical

Los ARN de las muestras que resultaron positivas a cada virus con valores de Ct \leq 35; 32 y 33 (para VDEN-1, VCHIK y VZIK respectivamente) fueron enviados en condiciones refrigeradas a la Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207), en Marsella, Francia, a partir de la colaboración existente con el Instituto Pasteur

de Guadalupe. Las muestras fueron sometidas a secuenciación nucleotídica de tercera generación empleando la tecnología *S5 Ion torrent* tal como se describió en la sección 2.3.5.3.2. Los cebadores empleados para la amplificación de los genomas virales de VCHIK⁽³⁵⁰⁾ y VZIK (8 y 12 parejas de cebadores respectivamente) se detallan en los anexos 2.6 y 2.4 respectivamente; mientras que para VDEN-1 (9 parejas de cebadores) se emplearon los publicados por⁽³⁵¹⁾.

2.4.5.5 Estimación de los parámetros de transmisión vertical

Los parámetros de TV describen la frecuencia con que un patógeno es transmitido verticalmente y la proporción de la progenie a la que infecta en una población de vectores⁽³⁴⁾. A partir de los resultados obtenidos, se estimaron parámetros de TV generales para cada CG y parámetros específicos para el 2^{do}CG.

Para cuantificar la frecuencia con que las madres transfirieron un virus determinado a su descendencia, se calculó la **tasa de transmisión vertical (TTV)** como la proporción de madres infectadas con al menos un miembro de su progenie infectado en cada CG⁽³⁴⁾. A partir de este parámetro general, se estimaron parámetros específicos en el 2^{do}CG (se tuvieron en cuenta exclusivamente a las madres que dejaron descendencia femenina de las que se pudo obtener muestras de saliva, por lo que lo no coincidieron necesariamente con la TTV general del 2^{do}CG) (figura 2.4):

- Tasa de transmisión vertical hasta cabeza (TTV-C): expresa la proporción de madres infectadas que dejaron hembras de la descendencia con infección diseminada (cabezas positivas) (estimada solamente para las madres expuestas a VDEN-).
- Tasa de transmisión vertical hasta saliva (TTV-S): expresa la proporción de madres infectadas que dejaron hembras de la descendencia con saliva positiva.
- Tasa de transmisión vertical hacia machos (TTV-M): expresa la proporción de madres infectadas que dejaron al menos un grupo de machos infectado.

Para cuantificar la proporción de descendientes que resultaron infectados en cada evento de TV, se estimó la **tasa de infección filial (TIF)** como el porcentaje de grupos/individuos infectados en la descendencia de madres que transmitieron verticalmente el virus.

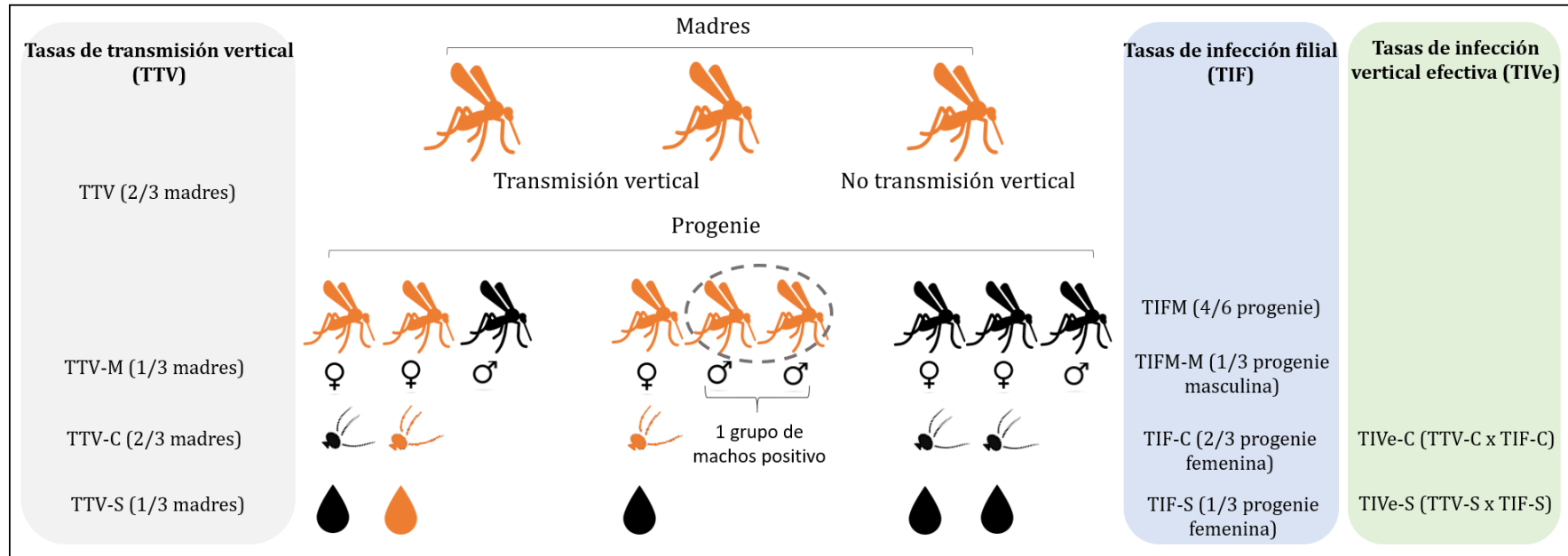


Figura 2.4 Representación esquemática de los parámetros de transmisión vertical calculados en los ensayos realizados con las poblaciones de *Aedes aegypti* (PTE y PRG) frente a los virus dengue-1, chikungunya y Zika. El color naranja simboliza mosquitos/muestras infectadas y el color negro mosquitos/muestras negativas. TTV: proporción de madres infectadas con al menos un miembro de su progenie infectada. TTV-M (hacia machos): proporción de madres infectadas que dejaron al menos un grupo de machos infectado. TTV-C (hasta cabeza): proporción de madres infectadas que dejaron hembras de la descendencia con infección diseminada (cabezas positivas). TTV-S (hasta saliva): proporción de madres infectadas que dejaron hembras de la descendencia con saliva positiva. TIF: proporción de la descendencia que resulta infectada en cada evento de TV. Cuando la progenie se examina en grupos, un grupo positivo se contabiliza como un individuo positivo y se estima la TIFM (mínima). TIFM (tasa de infección filial mínima): proporción de grupos de machos positivos de la progenie masculina de madres que experimentan TV. TIFM-M (tasa de infección filial mínima en machos): proporción de grupos de machos positivos de la progenie masculina de madres que experimentan TV. TIVE estima el promedio de la descendencia que resulta infectada por madre infectada. TIVE-C (hasta cabeza): promedio de hijas con infección diseminada (cabezas positivas) por madre infectada. TIVE-S (hasta saliva): promedio de hijas infectivas (salivas positivas) por madre infectada.

Debido a que en algunos casos la progenie se examinó en grupos, un grupo positivo se contabilizó como un individuo positivo, lo cual pudo subestimar la tasa real de transmisión filial⁽³¹⁷⁾. En esos casos la TIF se refirió como tasa de infección filial mínima (TIFM) en cada CG. A partir de este parámetro general, se estimaron parámetros específicos en el 2^{do}CG (figura 2.4):

- Tasa de diseminación filial (TIF-C): corresponde a la proporción de hijas con cabeza positiva de madres que experimentaron TV (estimada solamente para las madres expuestas a VDEN-1).
- Tasa de infectividad filial (TIF-S): corresponde a la proporción de hijas infectivas (con saliva positiva) de madres que experimentaron TV.
- Tasa de infección filial mínima en machos (TIFM-M): corresponde a la proporción de grupos de machos positivos de la progenie masculina de madres que experimentaron TV.

Además, se calculó la **tasa de infección vertical efectiva (TIVe)**, que describe la eficiencia de la TV, al estimar el promedio de la descendencia que resultó infectada por madre infectada, y se calculó multiplicando la TTV por la TIF^(34, 317). Este parámetro fue estimado en el 2^{do}CG solo con la progenie femenina (figura 2.4):

- Tasa de infección vertical efectiva hasta cabeza (TIVe-C): refleja el promedio de hijas con infección diseminada (cabezas positivas) por madre infectada (estimada solamente para las madres expuestas a VDEN-1). Se calcula multiplicando la TTV-C por la TIF-C.
- Tasa de infección vertical efectiva hasta saliva (TIVe-S): corresponde al promedio de hijas infectivas (salivas positivas) por madre infectada. Se calcula multiplicando la TTV-S por la TIF-S.

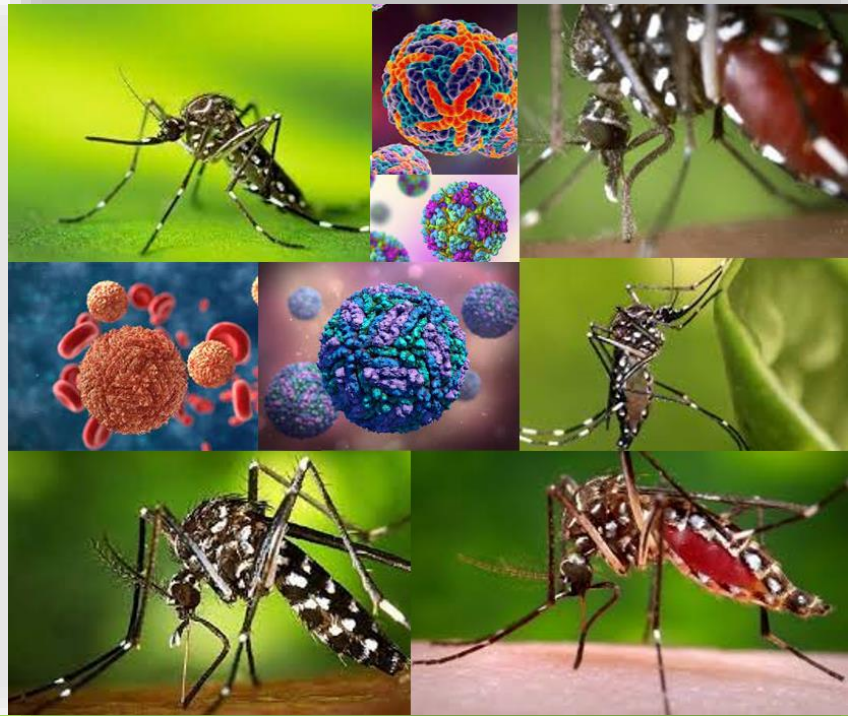
2.4.6 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos para la comparación de las diferentes tasas (TI, TD y TT; de los ensayos de CoV así como las TTV y TIFM de los ensayos de TV) fueron realizados en R v.3.3.2⁽³⁴⁵⁾. En el caso de los ensayos de CoV, para cada virus, se compararon las tasas entre las dos poblaciones de mosquitos y los diferentes dpe. Para cada dpe, se compararon las tasas de cada virus entre las poblaciones de mosquitos. En el caso de los ensayos de TV se compararon las tasas entre las dos poblaciones de mosquitos para cada

virus por CG. Adicionalmente, para cada población, se compararon además las tasas obtenidas con cada virus. Todas las comparaciones fueron realizadas usando las pruebas exactas de Fischer, y cuando fue necesario, se aplicaron pruebas exactas de Fischer múltiples (paquete “*rcompanion*”) con una modificación del nivel de significación por el procedimiento secuencial de Bonferroni. Las varianzas de las diferentes tasas se calcularon con intervalos de confianzas de 95% de una proporción binomial. En los ensayos de CoV, para cada virus, los títulos en las salivas se compararon entre las poblaciones de mosquitos usando la prueba de Wilcoxon. Debido a la baja cantidad de salivas positivas, estos resultados fueron todos estadísticamente no significativos. Todas las comparaciones con valores de $P > 0,05$ se consideraron no significativas.

2.5 Construcción de filogenias

Las secuencias obtenidas del genoma viral de los VDENS, VCHIK y VZIK en los mosquitos analizados (provenientes de los estudios de terreno y de los ensayos de laboratorio) se compararon con un panel de secuencias de referencia disponibles en la base de datos GenBank, las cuales fueron alineadas, utilizando el programa ClustalX⁽³⁵²⁾. El alineamiento se editó y analizó con el programa Bioedit version 7.2.5. (Manchester, United Kingdom)⁽³⁵³⁾. Se construyeron árboles filogenéticos siguiendo el criterio de máxima verosimilitud utilizando un re-muestreo (del inglés *bootstrapping*) de 1500 réplicas. En todos los casos el modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajuste fue determinado usando MEGA v7.0.26⁽³⁵⁴⁾. El modelo de sustitución nucleotídica GTR+G+I (del inglés *General Time Reversible* con la distribución γ de variación entre sitios y la proporción de sitios invariantes (I)) fue identificado como el modelo óptimo de evolución nucleotídica para los VDENS y VCHIK, mientras que el modelo Tamura-Nei+G fue el encontrado para VZIK.



Capítulo III

Resultados

III. RESULTADOS

3.1 Transmisión vertical de los virus del dengue y Zika en el contexto cubano

3.1.1 Primer estudio: periodo septiembre 2013 - julio 2014

A partir de las muestras de *Ae. aegypti* obtenidas, se formaron 111 grupos que se sometieron a la detección y serotipificación de los VDENS (tabla 3.1). De ellos, 37 resultaron positivos al menos a un VDEN (33%) y durante el periodo de estudio se detectaron los cuatro serotipos (figura 3.1). Esto ratifica la ocurrencia de transmisión vertical de los VDENS en las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas.

Las TIM totales en las áreas de salud oscilaron entre 6,6 (Grimau) y 11,6 (Los Pinos), aunque de forma general el municipio alcanzó un valor total de 9,0 (tabla 3.1). Durante el periodo estudiado, los meses que mostraron mayores TIM en todo el territorio fueron febrero/2014 (15,7) y noviembre/2013 (13,9), mientras que enero/2014 (0) y diciembre/2013 (2,4) exhibieron las más bajas (tabla 3.1).

3.1.1.1 Distribución espacio-temporal de los virus del dengue

La distribución de los VDENS en las áreas de salud del municipio Arroyo Naranjo durante el periodo de estudio se comportó de forma heterogénea (figura 3.1). En todas las áreas de salud se detectaron estadios inmaduros de *Ae. aegypti* infectados con los VDENS. Sin embargo, los cuatro serotipos se hallaron solamente en Mantilla y Párraga, mientras que en Grimau, Los Pinos y Capri aparecieron tres serotipos (VDEN-1, VDEN-2 y VDEN-3). En tanto, en Eléctrico y Managua se identificaron exclusivamente los VDEN-1 y VDEN-3. El serotipo que se encontró en mayor proporción en todo el periodo de estudio fue VDEN-1 (35%) y en orden decreciente: VDEN-3 (33%), VDEN-2 (25%) y VDEN-4 (6%) (figura 3.1).

En cuanto a las variaciones temporales de las proporciones de los VDENS en los grupos de *Ae. aegypti* de Arroyo Naranjo, se comprobó que excepto en enero, en todos los meses se detectó al menos un grupo de larvas y pupas positivo en el municipio (anexo 3.1). El serotipo viral de mayor frecuencia de aparición durante el periodo de estudio fue VDEN-3 (0,73), seguido por VDEN-1 (0,64), VDEN-2 (0,27) y VDEN-4 (0,18).

Tabla 3.1 Cantidad de ejemplares de *Aedes aegypti* recibidos (N), grupos formados (G), cantidad media de individuos por grupo (X), grupos positivos a algún serotipo de dengue (P) y tasa mínima de infección por los virus del dengue (TIM) por área de salud y meses de estudio.

		2013				2014							Total
		Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	
Mantilla	N	270	135	118	134	68	48	33	37	210	104	37	1194
	G	9	3	3	3	2	1	1	1	7	3	1	34
	X	30	45	39	44	34	48	33	37	30	35	37	35
	P	3	3	1	1	0	0	0	0	2	0	1	11
	TIM	11,1	22,2	8,5	7,5	0	0	0	0	9,5	0	27	9,2
Párraga	N	0	107	88	73	24	84	76	115	121	63	25	776
	G	0	2	2	2	1	2	2	3	3	2	1	20
	X	0	54	44	37	24	42	38	38	40	32	25	39
	P	0	1	1	0	0	3	0	1	1	0	0	7
	TIM	0	9,3	11,4	0	0	35,7	0	8,7	8,3	0	0	9,0
Grimau	N	0	187	132	89	89	68	31	99	44	19	0	758
	G	0	4	3	2	2	2	1	3	1	1	0	19
	X	0	47	44	45	45	34	31	33	44	19	0	40
	P	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	5
	TIM	0	5,3	7,6	0	0	14,7	0	10,1	0	52,6	0	6,6
Los Pinos	N	0	131	185	81	23	97	66	72	0	32	0	687
	G	0	3	4	2	1	2	2	2	0	1	0	17
	X	0	44	46	41	23	49	33	36	0	32	0	40
	P	0	1	3	0	0	1	2	1	0	0	0	8
	TIM	0	7,6	16,2	0	0	10,3	30,3	13,9	0	0	0	11,6
Capri	N	0	144	83	32	21	22	0	30	31	0	53	416
	G	0	3	2	1	1	1	0	1	1	0	1	11
	X	0	48	42	32	21	22	0	30	31	0	53	38
	P	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	TIM	0	6,9	24,1	0	0	0	0	0	0	0	0	7,2
Eléctrico	N	0	0	86	11	0	0	0	0	25	19	39	180
	G	0	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1	6
	X	0	0	43	11	0	0	0	0	25	19	39	30
	P	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
	TIM	0	0	11,6	0	0	0	0	0	40,0	0	0	11,1
Managua	N	0	27	27	0	0	0	18	0	0	19	0	91
	G	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	4
	X	0	27	27	0	0	0	18	0	0	19	0	23
	P	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	TIM	0	0	37,0	0	0	0	0	0	0	0	0	11,0
Total	N	270	731	719	420	225	319	224	353	431	256	154	4102
	G	9	16	17	11	7	8	7	10	13	9	4	111
	X	30	46	42	38	32	40	32	35	33	28	39	37
	P	3	7	10	1	0	5	2	3	4	1	1	37
	TIM	11,1	9,6	13,9	2,4	0	15,7	8,9	8,5	9,3	3,9	6,5	9,0

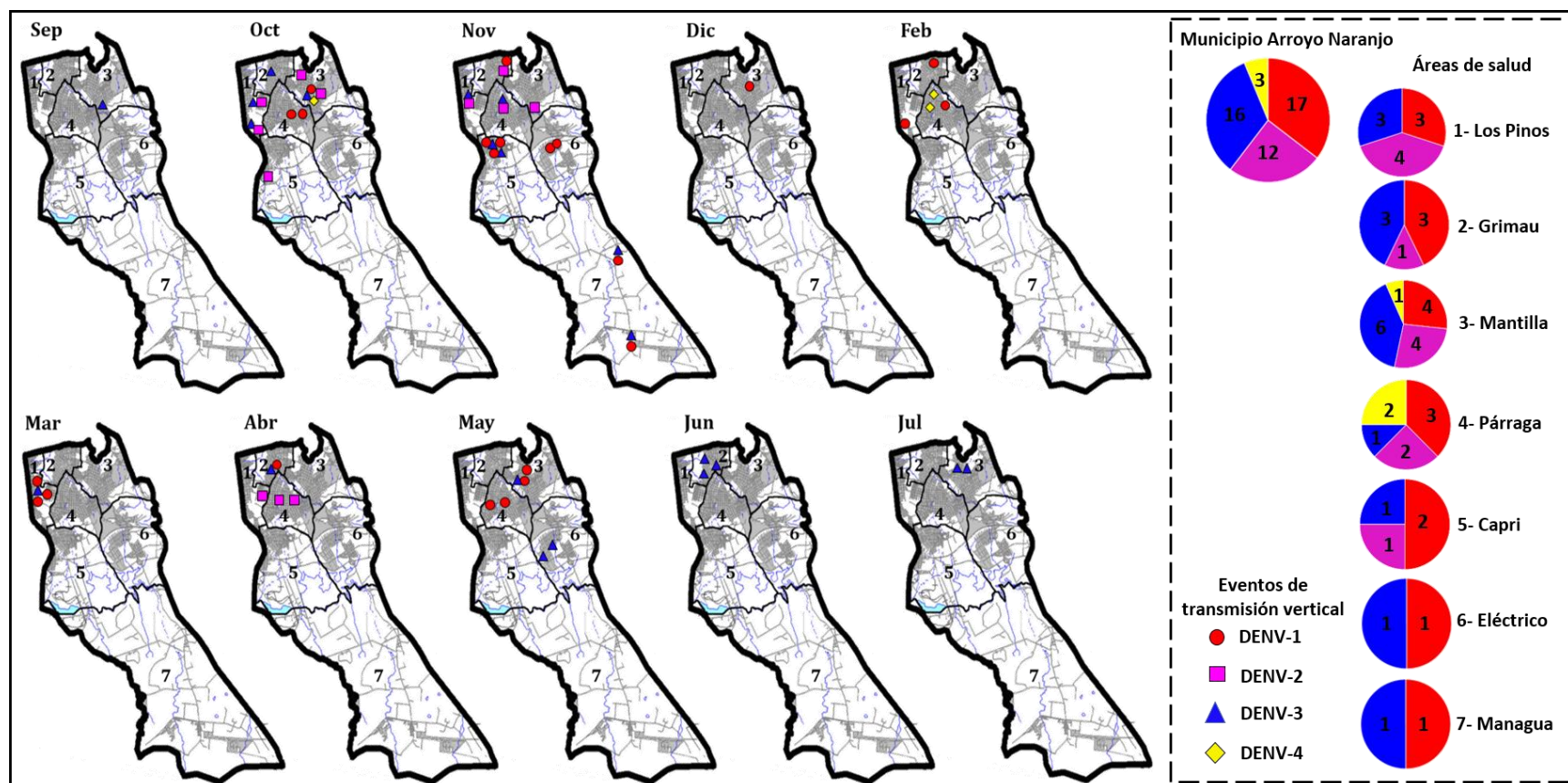


Figura 3.1 Distribución espacio-temporal de los virus del dengue encontrados en los grupos de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en Arroyo Naranjo entre septiembre/2013 – julio/2014. Las divisiones muestran las áreas de salud del municipio (1: Los Pinos, 2: Grimau, 3: Mantilla, 4: Párraga, 5: Capri, 6: Eléctrico y 7: Managua). Además, se muestra la proporción de los serotipos de dengue encontrados en los grupos de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* colectados en cada área de salud y el municipio Arroyo Naranjo entre septiembre 2013 y julio 2014. Los valores que aparecen al interior de los gráficos circulares se corresponden con el número de grupos de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* positivos a cada serotipo viral.

Se co-detectaron dos o más serotipos virales en diez grupos de los 37 positivos a VDEN. En los grupos donde hubo detección múltiple predominó la combinación VDEN-1/VDEN-3 (cinco grupos), mientras que las combinaciones VDEN-2/VDEN-3 (tres grupos) y VDEN-1/VDEN-2 (1 grupo) fueron menos frecuentes. Cabe destacar que la detección triple (VDEN-1/VDEN-2/VDEN-4) se produjo en un único grupo de estadios inmaduros colectados en Mantilla. Excepto en el área de salud Eléctrico, se encontraron grupos con más de un serotipo en el resto de las áreas: Mantilla (3), Grimaú (2), Los Pinos (2), Párraga (1), Capri (1) y Managua (1). En los meses de octubre y noviembre se detectaron siete de estos diez grupos, mientras que los otros tres fueron encontrados en los meses de marzo, abril y mayo. Tres de los grupos multi-infectados, estuvieron conformados por individuos colectados en un mismo sitio de cría en las áreas Mantilla (2) y Grimaú (1).

La distribución espacio-temporal de cada serotipo viral en el municipio Arroyo Naranjo se muestra en la figura 3.1. En octubre se detectaron los cuatro VDENs en los grupos de larvas y pupas de *Ae. aegypti* examinados, los cuales, además, se localizaron en el área de salud Mantilla. Asimismo, es destacable el mes de noviembre en donde aparecieron *Ae. aegypti* infectados en todas las áreas de salud del territorio. Las frecuencias de aparición de VDEN en *Ae. aegypti* fluctuaron espacialmente. El área de salud con mayor frecuencia de aparición de los VDENs en el vector fue Los Pinos (0,63) y en orden decreciente Grimaú (0,56), Mantilla (0,55), Párraga (0,5), Eléctrico (0,4) y Capri al igual que Managua (0,25).

3.1.1.2 Genotipificación de los virus del dengue

Debido a las pérdidas en cuanto a rendimiento que genera el método de purificación empleado (según describe⁽³⁵⁵⁾) no fue posible obtener productos útiles para secuenciación en todos los casos. Así, de los 37 grupos positivos a VDEN se lograron obtener cinco secuencias nucleotídicas: tres pertenecientes a VDEN-1, una perteneciente VDEN-4 y otra perteneciente a VDEN-3 (anexo 3.2). Del serotipo 2 no se obtuvo ninguna secuencia, probablemente debido al pequeño tamaño del fragmento amplificado (119 pb)⁽³⁵⁶⁾.

Las tres secuencias nucleotídicas de VDEN-1 obtenidas (D1_Pga_2013, D1_LP_2014 y D1_Grm_2014) correspondieron a muestras colectadas en (áreas de salud/fecha):

Párraga/octubre-2013, Los Pinos/febrero-2014 y Grimau/abril-2014 respectivamente. Las secuencias D1_LP_2014 y D1_Grm_2014 resultaron idénticas y solo se observó una mutación silente con respecto a D1_Pga_2013 en la posición 45 (A/G) del gen *prm* para un 0,4% de divergencia nucleotídica entre ellas. La filogenia realizada con las secuencias de VDEN-1 obtenidas de 275 nt y otras 82 de diferentes orígenes, almacenadas en el GenBank, reveló que estas pertenecieron al genotipo V (Americano/Africano) (figura 3.2).

La secuencia de VDEN-3 (D3_Mlla_2013) correspondió a una muestra colectada en el área de salud Mantilla en septiembre de 2013 y pertenece al genotipo III. La construcción filogenética que se muestra en la figura 3.3 se realizó con 53 secuencias de 257 nt de VDEN-3 de diferente origen, almacenadas en la base de datos GenBank.

La secuencia nucleotídica de VDEN-4 obtenida de un grupo de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* de Arroyo Naranjo (D4_Mlla_2013) correspondió a muestras colectadas en Mantilla en el mes de octubre de 2013. Según el árbol filogenético construido a partir de 46 secuencias de VDEN-4, de 345 nt, de diferente origen, almacenadas en la base de datos GenBank, la secuencia cubana perteneció al genotipo II (figura 3.4).

3.1.2 Segundo estudio: periodo mayo 2018 – marzo 2019

Los huevos colectados por medio de ovitrampas durante el periodo de estudio en ambas áreas de salud, rindieron un total de 5481 ejemplares de *Ae. aegypti* y 10 de *Ae. albopictus*. Esta última especie fue encontrada únicamente en el mes de junio en el área de salud PRG, en una sola ovitrampa. Los especímenes de *Ae. aegypti* obtenidos en el laboratorio se agruparon en 292 grupos (147 de PTE y 145 de PRG), aunque solo se analizaron entre el 70-95% de los individuos obtenidos.

Los índices de ovitrampa positiva (IOP) y densidad de huevos (IDH) permitieron estimar la abundancia relativa de *Ae. aegypti* en cada área. La comparación estadística de cada índice entre áreas arrojó que globalmente no existieron diferencias significativas (IOP $P = 0,47$; IDH $P = 0,76$) (anexo 3.3).

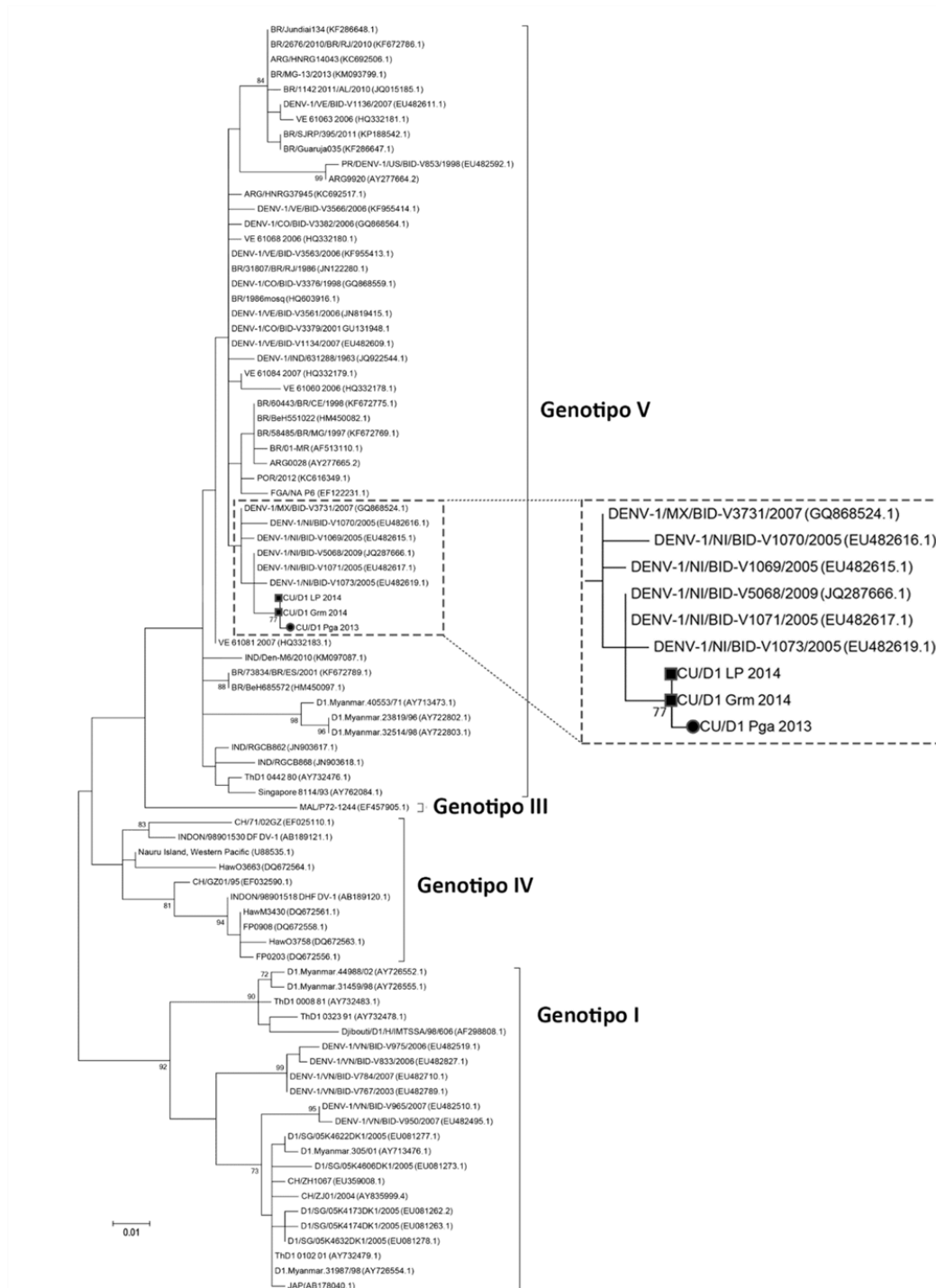


Figura 3.2 Árbol filogenético de VDEN-1 construido a partir del método de Máxima Verosimilitud, basado en el modelo GTR+G+I. Se muestran los valores de soporte estadístico de los nodos (*bootstrap*) superiores al 70%. Se indican los genotipos correspondientes. Las secuencias cubanas de VDEN-1 (fragmento ampliado) obtenidas a partir de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en el municipio Arroyo Naranjo (2013-2014), se distinguen con un círculo (D1_Pga_2013) y con un cuadrado (D1_LP_2014 y D1_Grm_2014).

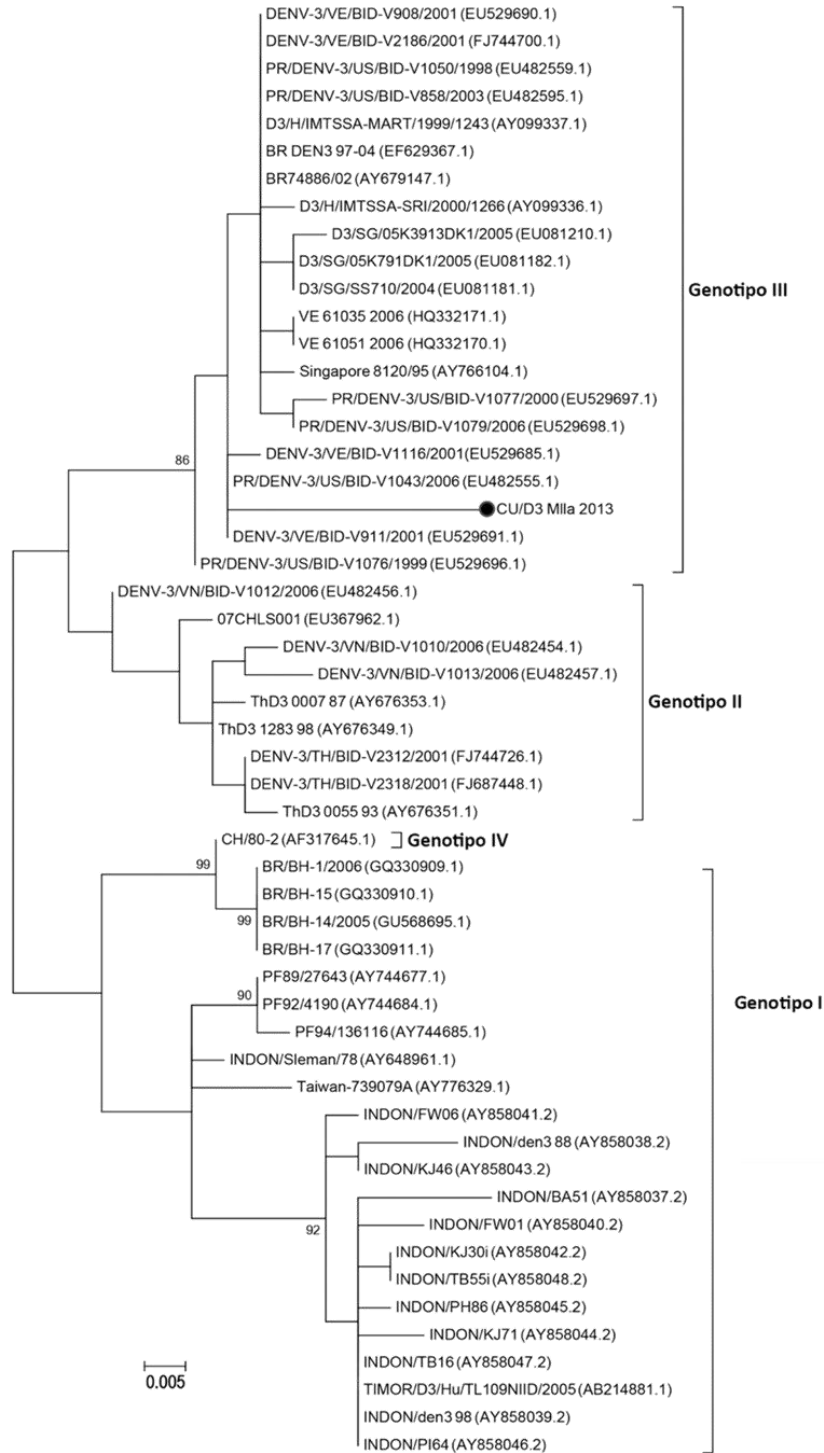


Figura 3.3 Árbol filogenético de **VDEN-3** construido a partir del método de Máxima Verosimilitud, basado en el modelo GTR+G+I. Se muestran los valores de soporte estadístico de los nodos (*bootstrap*) superiores al 70%. Se indican los genotipos correspondientes. La secuencia cubana obtenida a partir de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en el municipio Arroyo Naranjo se distinguen con un círculo (D3_Mlla_2013).

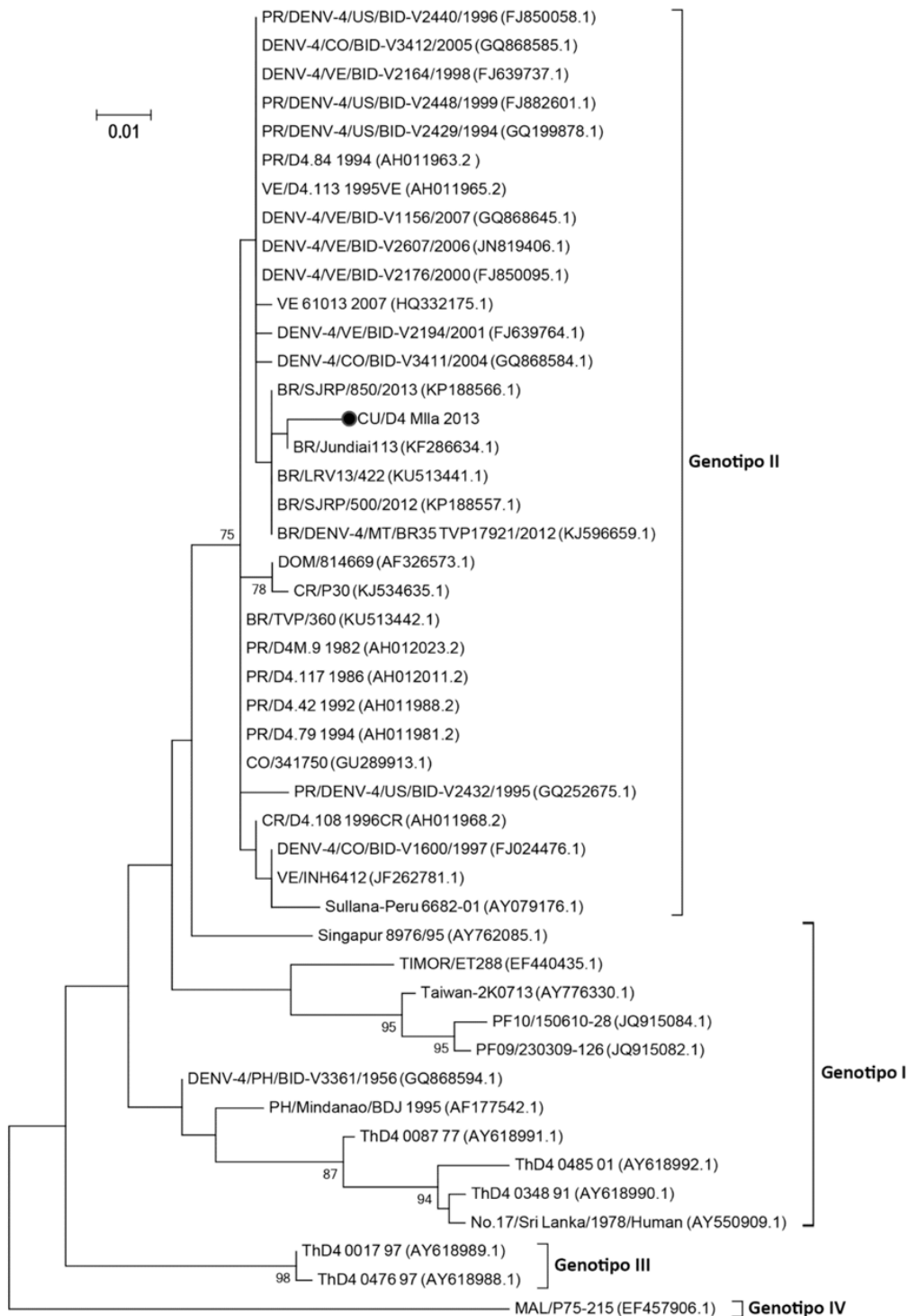


Figura 3.4 Arbol filogenético de **VDENV-4** construido a partir del método de Máxima Verosimilitud, basado en el modelo GTR+G+I. Se muestran los valores de soporte estadístico de los nodos (*bootstrap*) superiores al 70%. Se indican los genotipos correspondientes. La secuencia cubana obtenida a partir de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en el municipio Arroyo Naranjo se distinguen con un círculo (D4_Mlla_2013).

3.1.2.1 Distribución espacio-temporal de los virus del dengue en las áreas de estudio

Del total de grupos de *Ae. aegypti* formados, se seleccionaron 156 (82 de Pasteur y 74 de Párraga) colectados entre los meses mayo-diciembre/2018 (tabla 3.2), para la detección y serotipificación de los VDENS. Esta selección tuvo la intención de escoger los grupos de más de cinco individuos y que reunieran a más del 70% total de ejemplares colectados en cada área de salud por mes; con excepción de los meses mayo (45%) y septiembre (49%) en el área de salud Pasteur debido a pérdida de muestras por problemas en la cadena de frío.

De los grupos examinados, 23 resultaron positivos al menos a un VDEN (15%), de los cuales el 87% se localizó en PRG (tabla 3.2). Durante el periodo de estudio se identificaron tres serotipos virales (VDEN-1, VDEN-2 y VDEN-3) en los grupos de *Ae. aegypti* examinados. De los 23 grupos positivos, solo uno se encontró multi-infectado (VDEN-2/VDEN-3), el cual se halló en PRG-noviembre, proveniente de la misma ovitrampa. Estos resultados confirman la ocurrencia de transmisión vertical de los VDENS en poblaciones de este culícido de ambas áreas de salud.

La TIM total en PRG fue nueve veces superior a la de PTE, diferencia que resultó estadísticamente significativa ($P < 0,0002$) (tabla 3.2). Los valores de TIM en este último territorio oscilaron entre 0 y 38,5; mientras en PRG variaron entre 0 y 26,7. En ambas áreas, el mayor valor de TIM se observó en agosto.

De manera general, durante el periodo evaluado el serotipo que se encontró en mayor proporción fue VDEN-2 (75%) y en orden decreciente VDEN-3 (17%) y VDEN-1 (8%) (figura 3.5). En PTE solo se hallaron dos serotipos virales en proporciones y frecuencia de aparición de 67% y 0,25 para VDEN-3, y 33% y 0,13 para VDEN-2, respectivamente. En PRG se detectaron los tres serotipos: VDEN-2, VDEN-1 y VDEN3; en proporciones y frecuencia de aparición de 81% y 0,63 (VDEN-2), y 10% y 0,25 (para cada uno de los virus restantes) respectivamente. Se observó un patrón asimétrico de distribución espacio-temporal de los VDENS entre las áreas de salud estudiadas. La distribución espacial mostró mayor dispersión de los VDENS en Párraga que en Pasteur (figura 3.5).

Tabla 3.2 Cantidad de ejemplares de *Aedes aegypti* examinados (N), grupos formados (G), cantidad media de individuos por grupo (X), grupos positivos a los virus del dengue y Zika (P) y tasa de infección mínima (TIM) en las áreas de salud Pasteur (PTE) y Párraga (PRG) por meses de estudio.

		2018								2019			Total
		May	Jun	Jul	Ago	Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	
PTE	N	135	504	703	26	89	138	361	289				2245
	G	5	18	24	4	3	5	13	10				82
	X	27	28	29	6	29	27	27	28				27
	P	0	1	0	1	0	0	1	0				3
	TIM	0	2,0	0	38,5	0	0	2,8	0				1,3
	N	55	386	708	22	168	213	458	319	96	204	46	2675
	G	3	16	25	3	9	10	32	14	4	11	3	130
	X	18	24	28	7	19	21	14	23	24	19	15	21
	P	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	4
	TIM	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	14,7	0	1,5
PRG	N	424	228	79	75	112	346	321	464				2049
	G	14	8	4	6	4	12	11	15				74
	X	30	28	19	12	28	28	29	30				27
	P	3	4	1	2	0	0	6	4				20
	TIM	7,1	17,5	12,7	26,7	0	0	18,7	8,6				9,8
	N	544	264	74	80	172	454	370	444	0	0	194	2596
	G	27	12	4	7	9	23	15	15	0	0	10	122
	X	20	26	19	11	19	20	25	30	0	0	19	21
	P	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
	TIM	0	0	0	0	5,8	0	0	0	-	-	5,2	0,8
Total	N	559	732	782	101	201	484	682	753				4294
	G	19	26	28	10	7	17	24	25				156
	X	29	28	27	10	28	28	28	30				27
	P	3	5	1	3	0	0	7	4				23
	TIM	5,4	6,8	1,3	29,7	0	0	10,3	5,3				5,4
	N	599	650	782	102	340	667	828	763	96	204	240	5271
	G	30	28	29	10	18	33	47	29	4	11	13	252
	X	20	23	27	10	19	20	18	26	24	19	19	21
	P	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	1	6
	TIM	0	0	0	0	3,0	0	1,2	0	0	14,7	4,2	1,1

Fueron remarcables dos manzanas (561 y 732) en el área de salud Párraga donde se colectaron continuamente huevos de *Ae. aegypti* infectados con VDEN-2 en meses diferentes (figura 3.5). La manzana 561 resultó positiva reiteradamente en mayo, junio y noviembre, mientras que la 732 lo hizo en los meses de mayo y diciembre. Este fenómeno no se detectó en el área de salud Pasteur.

3.1.2.2 Distribución espacio-temporal del virus Zika en las áreas de estudio

Del total de grupos de *Ae. aegypti* formados, se seleccionaron 252 (130 de Pasteur y 122 de Párraga) colectados entre los meses mayo/2018-marzo/2019 (tabla 3.2), para la detección de VZIK. La selección se realizó en base a los mismos principios descritos en el acápite 3.3.2.1. De los grupos examinados, seis resultaron positivos (2,4%), de los cuales el 66,7% se localizó en Pasteur (tabla 3.2). Estos resultados demuestran, por primera vez, la ocurrencia de transmisión vertical de VZIK en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* en Cuba.

Las TIM totales de cada área no manifestaron diferencias significativas entre sí ($P = 0,69$). En Párraga el valor global fue 0,8; oscilando entre 0 y 5,8 a lo largo del estudio; mientras en Pasteur el valor total fue 1,5; variando entre 0 y 14,7 durante todo el periodo (tabla 3.2).

De manera general, los valores de Ct fueron elevados ($Ct > 33$) para todos los grupos de mosquitos positivos. Otros autores han referido comportamientos similares al emplear el mismo protocolo para detectar VZIK en mosquitos infectados colectados en el terreno^(357, 358) (comunicación personal Marta Geovanetti, Fiocruz), lo que sugiere bajos títulos virales⁽³⁵⁹⁾ o una limitación en las herramientas diagnósticas de que disponemos para detectar virus en mosquitos.

De manera general, VZIK apareció en las poblaciones de *Ae. aegypti* en cuatro de los 11 meses evaluados (septiembre y noviembre/2018, y febrero y marzo/2019). La distribución de la transmisión vertical de VZIK manifestó un patrón análogo entre las áreas de salud (figura 3.5), con frecuencias de aparición (0,2) similares en ambos territorios. Con excepción de Pasteur-febrero/2019, la distribución espacial de los grupos de mosquitos infectados estuvo restringida a una sola manzana cada mes (figura 3.5).

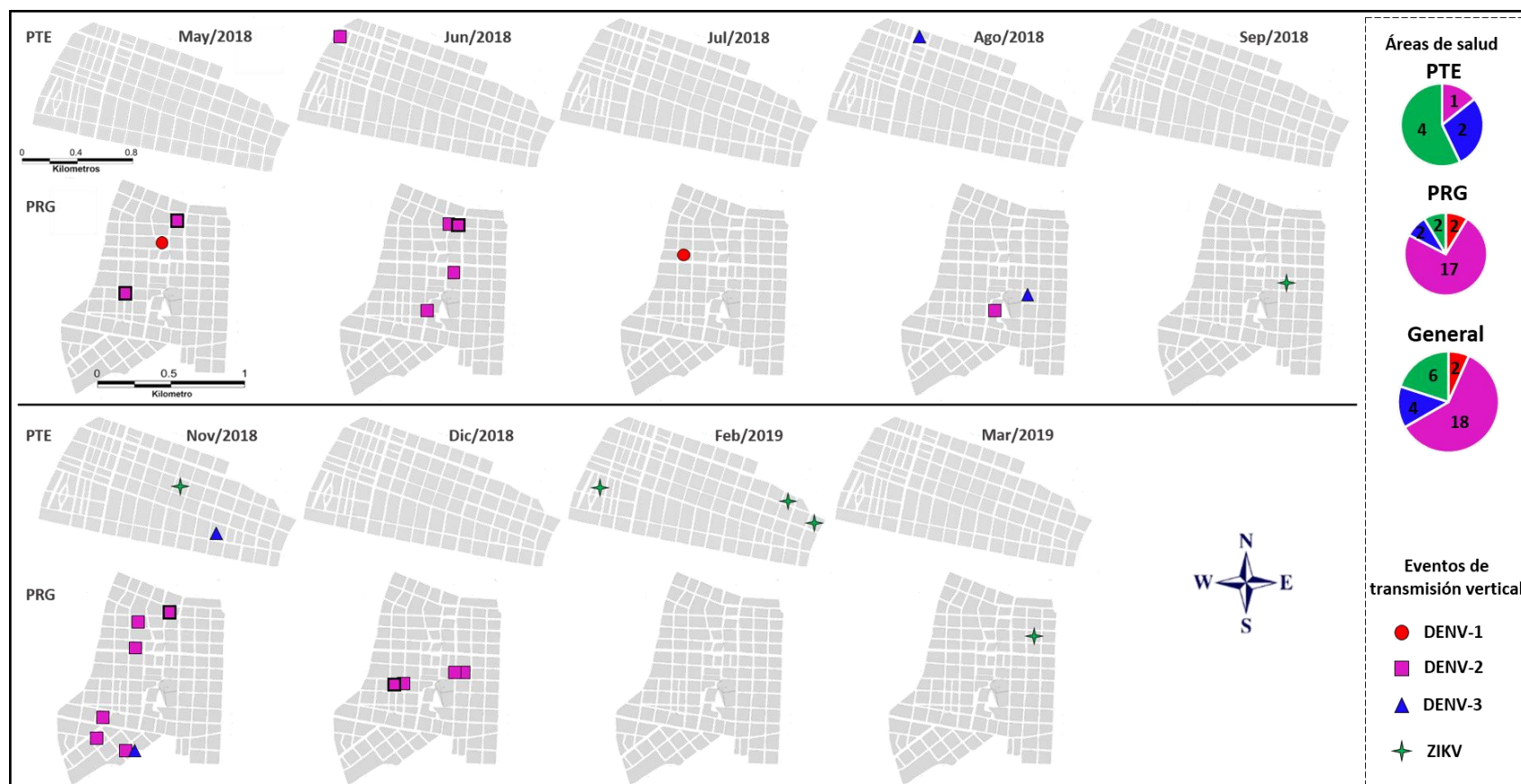


Figura 3.5 Distribución espacio-temporal de los grupos de *Aedes aegypti* positivos a los virus del dengue y Zika en las áreas de salud Pasteur (PTE) y Párraga (PRG), durante los meses mayo/2018-marzo/2019. Los gráficos circulares muestran la proporción de los virus del dengue y Zika encontrados en ejemplares de *Aedes aegypti* colectados en las áreas de salud durante el periodo estudiado. Los valores que aparecen al interior de los gráficos circulares se corresponden con el número de grupos de ejemplares de *Ae. aegypti* positivos a cada virus. Con bordes resaltados se destacan las manzanas en las que se colectaron reiteradamente huevos de *Ae. aegypti* infectados.

3.1.2.2.1 Genotipificación del virus Zika

Debido a los altos valores de Ct de las muestras positivas a VZIK, no se pudo obtener productos útiles para la secuenciación en todos los casos. Así, de los seis grupos positivos se logró obtener una secuencia (Z_Pga_2019, Número de acceso: PP759388) de 2950 nt, en mosquitos colectados en Párraga-marzo/2019, que abarcó las posiciones del genoma entre la 7295 y 10 244, cubriendo parte de los genes *ns4B* y *ns5*. La secuencia obtenida compartió 99,9% de identidad con otra procedente de Martinica, aislada de suero humano en 2015 (KU647676.1). La filogenia realizada con nuestra secuencia de VZIK y otras 63 de diferentes orígenes, almacenadas en el GenBank, reveló que pertenece al genotipo asiático, linaje americano (figura 3.6).

3.2 Competencia vectorial de poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana a arbovirus

3.2.1 Competencia vectorial de las poblaciones PTE y PRG a los flavivirus dengue-1 y Zika

Ambas poblaciones de *Ae. aegypti* mostraron susceptibilidad para infectarse con los flavivirus ensayados, pero de manera general, fueron menos susceptibles a VDEN-1 (TI entre 24-79%) que a VZIK (TI entre 79-97%), especialmente a los 7 dpe ($P = 0,03$ para PTE; $P < 0,0001$ para PRG) (figura 3.7). No se encontraron diferencias estadísticas en las TI entre las poblaciones de mosquitos ni entre los dpe para VZIK, mientras que para VDEN-1 la TI media en PRG fue menor (37%) que la de PTE (74%), siendo estadísticamente significativa a los 7 dpe ($P = 0,003$).

Las TD variaron entre 14-67% para VZIK y 6-54% para VDEN-1 (figura 3.7). No se observaron diferencias estadísticas en las TD entre las poblaciones ni los virus al mismo dpe. Sin embargo, las TD se incrementaron hacia los 14 dpe para ambos virus independientemente de la población de mosquitos ($P < 0,05$ para todas las combinaciones población de mosquito/virus).

Con relación al potencial de transmisión, se observaron bajas TT para ambos virus en las dos poblaciones (figura 3.7). No se detectaron partículas de VZIK en la saliva de ninguna de las hembras examinadas de la población PTE, mientras que el virus fue detectado desde los 7 dpe en la saliva de mosquitos de PRG (TT_{PRG/VZIK} entre 4-9%).



Figura 3.6 Árbol filogenético de **VZIK** construido a partir del método de Máxima Verosimilitud, basado en el modelo Tamura-Nei+G. Se muestran los valores de soporte estadístico de los nodos (*bootstrap*) superiores al 70%. Se indican los genotipos correspondientes y la secuencia cubana (Z_Pga_2019) obtenida a partir de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en el municipio Arroyo Naranjo con un círculo.

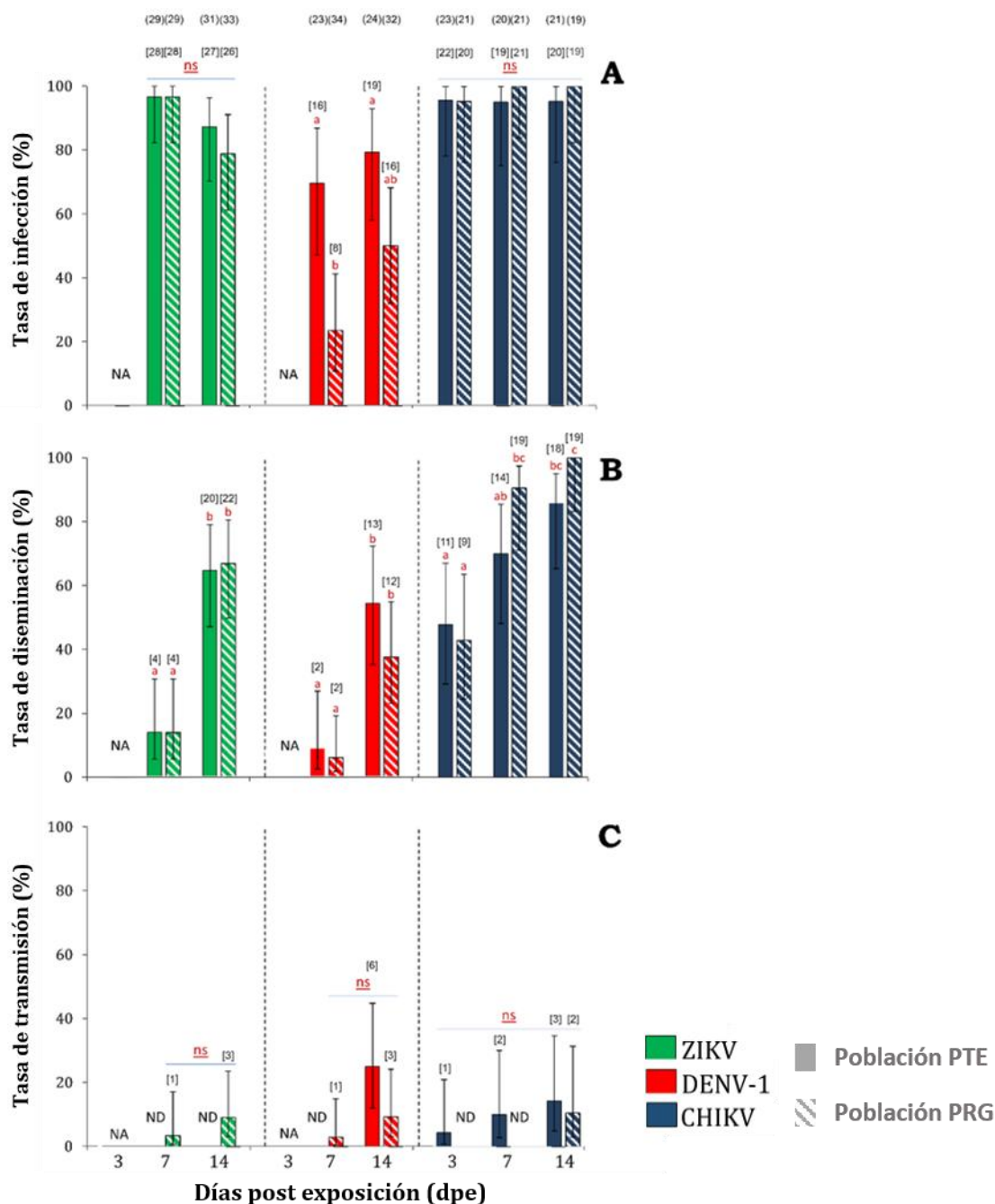


Figura 3.7 Tasas de infección (A), diseminación (B) y transmisión (C) (intervalo de confianza $\pm 95\%$) de dos poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana: PTE y PRG, a los tres, siete y 14 días post exposición (dpe) a los virus Zika, dengue-1 y chikungunya. La población PTE se representa con barras continuas y la población PRG con barras discontinuas. ND: no detectado. NA: no ensayado. ns: no significativo ($P > 0,05$). Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las poblaciones y/o los dpe para un virus determinado. El número de individuos examinados para cada población/virus/dpe está colocados entre paréntesis. Los números entre corchetes indican las muestras positivas para cada población/virus/dpe.

Para VDEN-1, el virus fue detectado en la saliva de hembras de la población PRG a los 7 dpe (TT=3%), pero no en PTE hasta los 14 dpe. En este tiempo, las TT de PTE (25%) y de PRG (9%), no fueron estadísticamente diferentes ($P = 0,15$). De igual forma, tampoco se observaron diferencias estadísticas en las TT ni los títulos virales entre VZIK y VDEN-1 a ningún dpe. Los títulos virales medios detectados en salivas de la población PRG infectada con VDEN-1 a los 7 y 14 dpe alcanzaron un valor de $1,2 \pm 0,7 \log_{10}$ uff/saliva, mientras que para VZIK fue de $1,5 \pm 0,2 \log_{10}$ uff/saliva (tabla 3.3).

Tabla 3.3 Títulos virales medios (\pm DE) estimados en la saliva de hembras de dos poblaciones de *Aedes aegypti* (PTE y PRG) de La Habana, después de 3, 7 y 14 días de ser expuestas a los virus Zika (VZIK), dengue-1 (VDEN-1) y chikungunya (VCHIK).

Virus	PTE Log ₁₀ título (uff/saliva)*						PRG Log ₁₀ título (uff/saliva)*					
	3dpe		7dpe		14dpe		3dpe		7dpe		14dpe	
	Media	\pm DE	Media	\pm DE	Media	\pm DE	Media	\pm DE	Media	\pm DE	Media	\pm DE
VZIK	NE	-	ND	-	ND	-	NE	-	1,5 (1)	Nap	1,5 (3)	$\pm 0,3$
VDEN-1	NE	-	ND	-	1,2 (6)	$\pm 1,0$	NE	-	1,9 (1)	Nap	1,0 (3)	$\pm 0,7$
VCHIK	1,2 (1)	Nap	2,0 (2)	$\pm 1,1$	2,6 (3)	$\pm 1,5$	ND	-	ND	-	2,3 (2)	$\pm 1,1$

Entre paréntesis se muestra el número de muestras de saliva positivas. NE: no ensayado, ND: No detectado, Nap: no aplica, dpe: días post exposición. *Para VDEN-1, el título viral se expresa en unidades formadoras de foco (uff)/saliva.

3.2.2 Competencia vectorial de las poblaciones PTE y PRG al alfavirus chikungunya

La habilidad de las poblaciones PTE y PRG para infectarse, diseminar y transmitir VCHIK fue evaluada a los tres, siete y 14 dpe (figura 3.7). Ambas poblaciones fueron altamente susceptibles a la infección con VCHIK, con TI entre 95-100% a los 3 dpe. La diseminación también fue detectada desde los 3dpe y creció significativamente en ambas poblaciones de mosquitos a los 7 y 14 dpe, alcanzando, en este último punto, valores entre 86 y 100% (figura 3.7). Sin embargo, el potencial de transmisión fue bajo en las dos poblaciones, con TT similar en PTE (entre 4 -14%) y PRG (entre 0-11%). Los mosquitos de PTE

expectoraron virus desde los 3 dpe, mientras que en PRG el virus fue detectado en la saliva de las hembras por primera vez a los 14 dpe. El valor medio del título de VCHIK en la saliva de las hembras de PRG osciló entre 0-2,3 \log_{10} ufp/saliva, mientras que en mosquitos de PTE llegó a valores entre 1,2-2,6 \log_{10} ufp/saliva y alcanzó un máximo a los 14 dpe (tabla 3.3).

3.3 Transmisión vertical de arbovirus en poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana, en condiciones de laboratorio

3.3.1 Tasas de transmisión vertical e infección filial mínima de los virus dengue-1, chikungunya y Zika en las poblaciones PTE y PRG

Ambas poblaciones de *Ae. aegypti* mostraron capacidad similar para transmitir verticalmente los virus ensayados, sin diferencias estadísticas entre ellas en los parámetros de TV en ninguno de los dos CG ($P > 0,05$ en todos los casos) (figura 3.8). Durante el 1^{er}CG, la TTV de VDEN-1 alcanzó un valor de 29% en PTE y 0 en PRG, mientras que para VZIK llegó al 29%, en ambas poblaciones. Por su parte, globalmente, de las hembras de las dos poblaciones (N=47) transmitieron VCHIK a su progenie el 49%. Sin embargo, la TTV varió entre 27% en PTE y 59% en PRG. La comparación de las TTV entre virus solo mostró diferencias estadísticamente significativas en la población PRG, entre las combinaciones PRG-VDEN-1 y PRG-VCHIK ($P = 0,002$) (figura 3.8). Es de destacar que se obtuvieron cerca de cuatro veces más madres infectadas con VCHIK que con VDEN-1, lo que explica las diferencias encontradas. En este mismo CG, las TIFM globales de los tres virus mostraron cifras muy similares en un rango entre 5 y 7% para las dos poblaciones (figura 3.8). Como promedio, los huevos del 1^{er}CG fueron depositados por las hembras a los 8,8 dpe a VDEN-1; 7,9 dpe a VCHIK y 7,8 dpe a VZIK.

En el 2^{do}CG, las TTV globales fueron más similares entre sí, con valores de 44% para VDEN-1 (67% en PTE y 33% en PRG), 54% para VZIK (67% en PTE y 50% en PRG) y 47% para VCHIK (25% en PTE y 54% en PRG). Las TIFM globales del 2^{do}CG fueron ligeramente más variables entre virus, con valores de 11% para VCHIK, 9% para VZIK y 5% para VDEN-1. La mayor tasa de infección en la descendencia se observó en la combinación PTE/VCHIK en el 2^{do}CG (13%) (figura 3.8). La comparación estadística de las TTV y las TIFM entre virus en cada población no arrojó diferencias significativas.

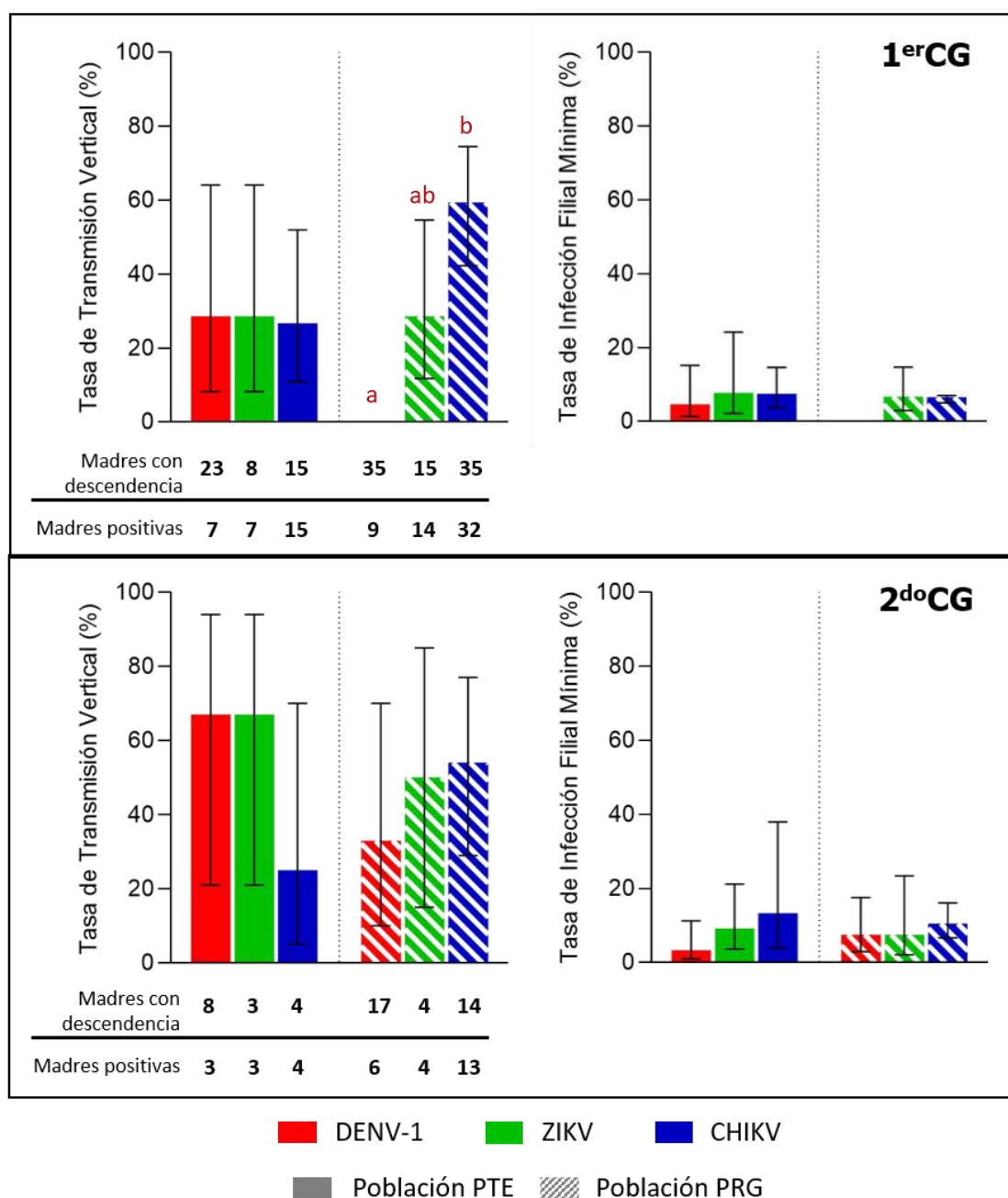


Figura 3.8 Tasas de transmisión vertical (TTV) y de infección filial mínima (TIFM) de los primer (1^{er}CG, panel superior) y segundo ciclos gonadotróficos (2^{do}CG, panel inferior) (intervalo de confianza \pm 95%) de dos poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana: PTE y PRG a los virus dengue-1, Zika y chikungunya. La población PTE está representada con barras continuas y la población PRG con barras discontinuas. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los virus para una población determinada. Las tablas al pie de los gráficos de las TTV muestran el número de madres que dejaron descendencia en cada CG y las que resultaron infectadas (positivas) para cada población/virus. La TTV representa la proporción de madres infectadas con al menos un miembro de su progenie infectado. La TIFM representa la proporción de grupos/individuos infectados en la descendencia de madres que transmitieron verticalmente el virus.

Como promedio, los huevos del 2^{do}CG fueron depositados por las hembras a los 21,8 dpe a VDEN-1; 21,1 dpe a VCHIK y 19,2 dpe a VZIK.

Dada la manera diferente en que se procesó la descendencia de los 1^{er} y 2^{do}CG, la comparación de las TTV y TIFM entre ellos no resultó válida.

La secuenciación nucleotídica de las muestras con valores más bajos de Ct, permitió la obtención de secuencias en algunas muestras de la descendencia de madres expuestas a los tres virus, con lo que se confirmó el diagnóstico realizado por RT-qPCR (anexo 3.4).

En el caso de VDEN-1, se obtuvieron secuencias parciales de dos cabezas de hijas del 2^{do}CG, mientras que una secuencia completa de VCHIK se obtuvo de la saliva de una hija proveniente también del 2^{do}CG. En tanto, la secuencia nucleotídica de VZIK se obtuvo de un grupo de descendientes del 1^{er}CG.

3.3.2 Estimación del aporte de la transmisión vertical a la transmisión horizontal

Para indagar en el potencial epidemiológico de hembras de *Ae. aegypti* infectadas por vía materna, se analizó la saliva de la descendencia femenina de madres expuestas a VDEN-1, VCHIK y VZIK. En este caso los resultados se muestran de forma unificada y no por poblaciones de mosquitos. Para la estimación de estos parámetros de TV se tuvo en cuenta exclusivamente la sub-población total de madres (N = 23) de las que se pudo conseguir muestras de saliva de sus hijas.

Los datos obtenidos demostraron la presencia de partículas virales en la saliva de hijas provenientes de madres infectadas con VCHIK y VZIK, mientras que ningún virus se detectó en las hijas de madres infectadas con VDEN-1 (tabla 3.4, figura 3.9). Sin embargo, el 80% (TTV-C) de las madres infectadas pudo transmitir VDEN-1 al menos hasta la cabeza de una de sus hijas (tabla 3.4, figura 3.9).

En el caso de VCHIK, el 50% de las madres infectadas transfirió el virus al menos a una de sus hijas (virus detectado en saliva), convirtiéndolas en infectivas. Esta fue la mayor TTV-S en relación a la de VZIK (TTV-S = 17%) (tabla 3.4, figura 3.9). De las 11 salivas positivas a VCHIK, cinco fueron detectadas por titulación directa de la muestra y siete por RT-qPCR después de su amplificación en cultivo celular. El valor medio del título de VCHIK fue $2,3 \pm 1,0 \log_{10}$ ufp/saliva, que osciló en un rango entre 1,2 y 3,3 \log_{10} ufp/saliva.

Tabla 3.4 Datos y parámetros de transmisión vertical obtenidos del segundo ciclo gonadotrófico de hembras de *Aedes aegypti* expuestas a los virus dengue-1, chikungunya y Zika

	Descripción	VDEN-1	VCHIK	VZIK
	Madres expuestas a virus	73	51	23
	Madres con descendencia en el 2 ^{do} CG *	12	12	6
	Madres infectadas	5	12	6
	Madres que transmiten el virus verticalmente en el 2 ^{do} CG*	4	7	4
	Saliva de hijas provenientes de madres infectadas	42	72	28
Muestras obtenidas	Saliva de hijas provenientes de madres que transmiten verticalmente el virus	37	58	25
	Hijas con salivas infectadas	0	11	3
	Hijas con cabezas infectadas**	6	NE	NE
	Familias con grupos de machos infectados	0	4	3
	Grupos de machos infectados	0	6	3
	Familias con hijas con salivas infectadas y grupos de machos infectados simultáneamente	0	3	0
	TTV-S	0	50	17
	TTV-C **	80	NE	NE
	TTV-M	0	33	50
Parámetros de transmisión vertical (%)	TIF-S	0	19	12
	TIF-C**	16	NE	NE
	TIFM-M	0	5	7
	TIVe-S	0	10	2
	TIVe-C**	13	NE	NE

*Se refiere exclusivamente a las madres que dejaron descendencia femenina de las que se pudo obtener muestras de saliva. ** Solo se ensayó para la descendencia de madres expuestas a VDEN-1. TTV-S (tasa de transmisión vertical hasta saliva): proporción de madres infectadas que deja hijas con saliva positiva. TTV-C (tasa de transmisión vertical hasta cabeza): proporción de madres infectadas que deja hijas con cabezas positivas. TTV-M (tasa de transmisión vertical hacia machos): proporción de madres infectadas que deja grupo de machos infectado. TIF-S (tasa de infectividad filial): proporción de hijas con saliva positiva provenientes de madres que transmitieron verticalmente el virus. TIF-C (tasa de diseminación filial): proporción de hijas con cabeza positiva provenientes de madres que transmitieron verticalmente el virus. TIFM-M (tasa de infección filial mínima en machos): proporción de machos infectados en la progenie masculina de madres que transmitieron verticalmente el virus (un grupo positivo asume un individuo infectado). TIVe-S (tasa de infección vertical efectiva hasta saliva): promedio de hijas infectivas por madre infectada. TIVe-C (tasa de infección vertical efectiva hasta cabeza): promedio de hijas con infección diseminada por madre infectada. NE: no ensayado.

Ninguna de las muestras de saliva tituladas directamente resultó positiva a VZIK. Sin embargo, tras su amplificación en células Vero, tres muestras (provenientes de la misma madre) provocaron efecto citopático en la monocapa celular y sus sobrenadantes fueron positivos por RT-qPCR. Para VDEN-1, las seis cabezas de hijas positivas solo fueron detectadas por RT-qPCR tras su amplificación en células C6-36.

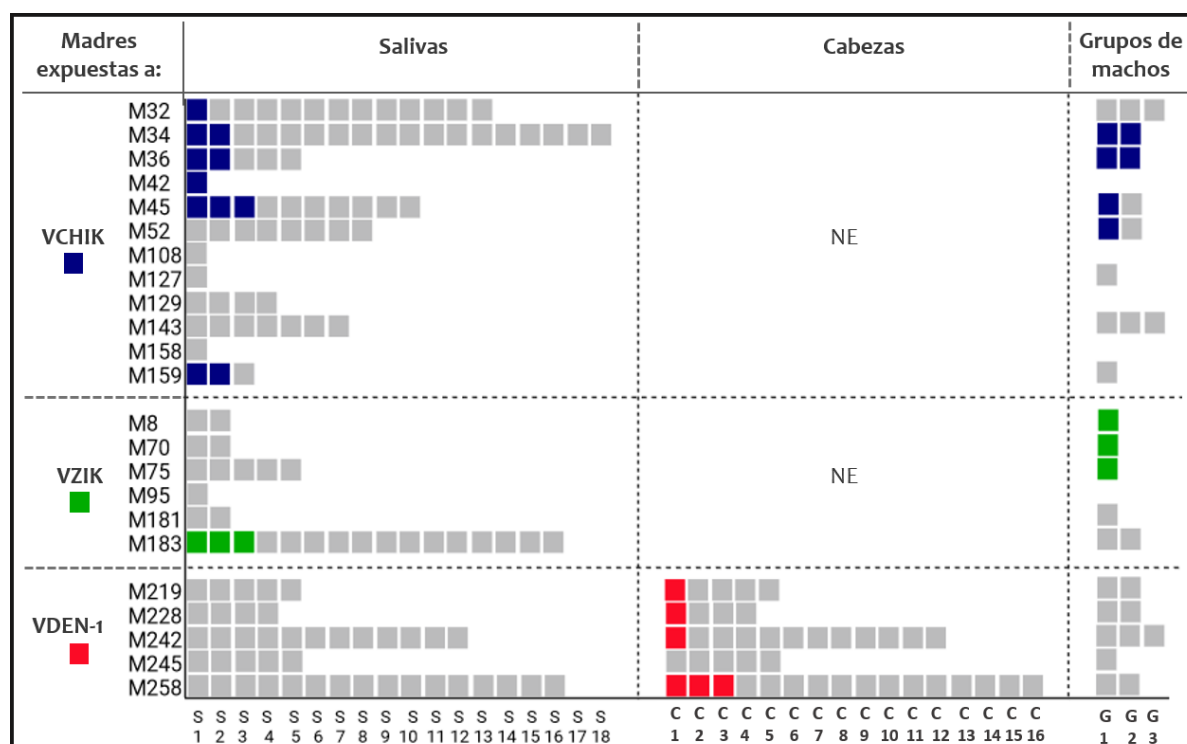
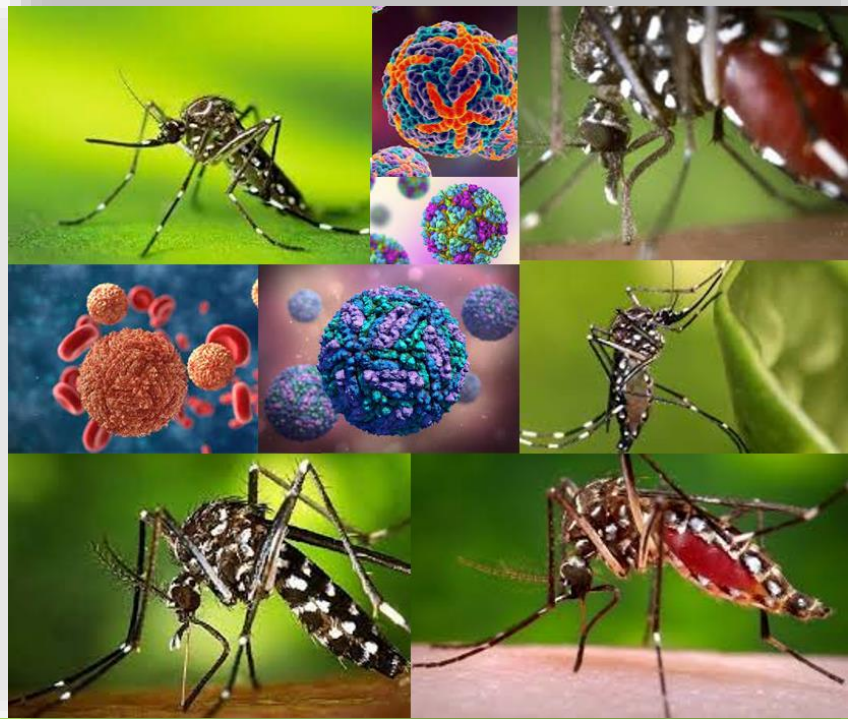


Figura 3.9 Mapa de calor con muestras positivas (de color azul para el virus chikungunya (VCHIK), verde para el virus Zika (VZIK) y rojo para el virus dengue-1 (VDEN-1)) y negativas (de color gris) de la progenie del segundo ciclo gonadotrófico proveniente de madres de *Aedes aegypti* expuestas a los virus dengue-1, chikungunya y Zika. Se representan las muestras de salivas y cabezas de hijas y grupos de machos de la descendencia de madres expuestas a cada virus. M: madre infectada, S: muestra de saliva de una hija, H: muestra de cabeza de una hija, P: grupo de machos de la descendencia, NE: no ensayado.

Las hijas infectivas (con salivas positivas a VCHIK) constituyeron el 19% (TIF-S) del total de hembras provenientes de madres que transmitieron el virus verticalmente (tabla 3.4). En tanto, la TIF-S para VZIK representó un 12%. Por su parte, el 16% (TIF-C) de la descendencia femenina de las madres que transmitieron VDEN-1 verticalmente, presentaron diseminación viral en la cabeza (tabla 3.4).

La TV a la descendencia masculina varió según el virus. Las TTV-M alcanzaron valores de 0 para VDEN-1 (donde no se encontró ningún grupo de machos positivo de los 10 obtenidos y analizados en el 2^{do}CG); 33% para VCHIK y 50% para VZIK. En todos los casos se observó que la infección de la descendencia se comportó de forma heterogénea. Para VCHIK, el 25% de las madres infectadas transmitió el virus hasta la saliva de hembras y a grupos de machos simultáneamente, mientras que para VZIK no se halló coincidencia en la transmisión simultánea del virus a ambos géneros (tabla 3.4, figura 3.9). Por último, las tasas de infección vertical efectiva (TIVe) que indican el promedio de descendencia infectada por madre infectada, estuvieron por debajo del 15% en todos los casos, tanto las TIVe-S de VCHIK (10%) y VZIK (2%), como la TIVe-C de VDEN-1 (13%) (tabla 3.4).



Capítulo IV

Discusión

IV. DISCUSIÓN

4.1 Transmisión vertical de los virus del dengue y Zika en el contexto cubano

La dinámica de transmisión de arbovirus (entiéndase VDENS, VCHIK y VZIK) por *Ae. aegypti* ha sido pobremente estudiada en Cuba. Es por eso que la investigación de los modos en que esos virus se transmiten por sus vectores resulta novedosa y de importancia capital en el campo de la arbovirología. Los resultados aquí presentados constituyen el primer estudio que demuestra la ocurrencia de TV de los cuatro serotipos de dengue y el virus Zika en poblaciones cubanas de *Ae. aegypti*, en particular en dos municipios de La Habana. Adicionalmente, las secuencias nucleotídicas obtenidas confirmaron la identidad del virus y pertenecieron a los genotipos virales que circularon en Cuba^(195, 360) y la región latinoamericana^(361, 362) en los periodos de estudio (2013-2014 y 2018-2019), lo que demuestra la certeza y valor de estos resultados.

Durante el primer periodo de estudio, la ocurrencia de TV de los VDENS en *Ae. aegypti* se constató prácticamente en todos los meses analizados y en todas las áreas de salud del municipio (inclusive en aquella con menores reportes históricos de incidencia de dengue en la población humana, como Managua⁽³³²⁾). De manera similar, durante 2018-2019, se verificó la TV de ambos flavivirus tanto en el territorio catalogado de alta transmisión (Párraga), como en el de baja transmisión (Pasteur). Varios autores declaran que la TV no ocurre en determinadas poblaciones de mosquitos o que en algunos contextos ocurre con baja frecuencia⁽³⁰⁴⁻³⁰⁶⁾. Los resultados de la presente investigación sugieren que la TV de estos flavivirus en las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas, podría constituir un proceso fisiológico intrínseco de la infección, aunque su frecuencia e intensidad pueden depender del contexto epidemiológico, o de los genotipos de los mosquitos y virus. Según está descrito, durante la colonización de *Ae. aegypti*, los viriones pueden alcanzar los ovarios y el tejido reproductivo en general⁽²⁶³⁾ y de esta manera perpetuarse en la próxima generación.

Si bien la relevancia epidemiológica de la TV todavía está en discusión^(30, 34), es un hecho que vectores potencialmente infectantes permanecen en la naturaleza por periodos de

tiempo relativamente largos en forma de huevos^(34, 363). Una vez que estos huevos eclosionan, a la par del desarrollo larvario ocurre la replicación viral, de modo que cuando una hembra infectada emerge, pudiera ser infecciosa y capaz de transmitir el virus⁽³⁰⁸⁾ sin tener que ponerse previamente en contacto con un humano infectado. Hasta el momento no existen evidencias que aseguren tal hipótesis, por lo que un objetivo de la presente tesis fue explorar si la TV pudiera aportar directamente hembras infecciosas para iniciar nuevos ciclos de TH.

La distribución espacial de los VDENS en Arroyo Naranjo, durante el primer periodo de estudio, se manifestó de forma estratificada. Las áreas en las que se detectaron los cuatro VDENS (Mantilla y Párraga) son las más pobladas del municipio (anexo 2.2). Previamente en La Habana se comprobó que territorios con mayor densidad poblacional contabilizaban mayor cantidad de sitios de cría de *Ae. aegypti* ⁽³⁶⁴⁾. En el municipio estudiado, dadas las dificultades en el abasto de agua, los moradores se ven obligados a almacenarla permanentemente, lo que podría dar lugar a sitios de cría de *Ae. aegypti*⁽³⁶⁵⁾. Todas estas características favorecen la existencia de poblaciones de este culicido que exhibe en estas áreas una presencia elevada (Índice Casa (IC)_{Mantilla}=1,4; IC_{Párraga}=1,1)⁽³³⁰⁾. De esta manera se potencia el contacto vector-hombre y con ello el riesgo de transmisión de los VDENS⁽²⁵⁾.

Una explicación análoga podría tener la distribución de los VDENS en el resto de las áreas de salud. Así, en orden decreciente de población por área aparecen Grimau, Los Pinos, Capri (en las que se encontraron tres VDENS), Eléctrico y Managua (en las que se encontraron solo dos VDENS), en las cuales una tendencia similar de presencia del vector se encontró (IC_{Grimau}=1,3 > IC_{Los Pinos} =1,3 > IC_{Capri}=0,33 > IC_{Eléctrico}=0, 23 > IC_{Managua}=0,17)⁽³³⁰⁾. Los elementos antes expuestos reflejan las probabilidades de contacto vector-hombre en estas áreas: potenciada para Grimau, Los Pinos y Capri, y disminuida para Eléctrico y Managua.

Además, en las áreas de salud más cercanas al centro de la provincia La Habana (Grimau, Los Pinos, Párraga, Mantilla) existe mayor flujo y confluencia de personas. De manera general, en ellas están ubicadas la mayoría de las oficinas y comercios, así como los principales centros de trabajo, estudio y recreación de la población del municipio, lo cual facilita que en ellas converjan mayor número de personas. Dado el rango de vuelo de *Ae.*

aegypti, se propone que la movilidad humana, más que la dispersión del vector, es el determinante principal de la amplificación y distribución de los VDENS^(215, 366, 367). Así, los VDENS incrementan su potencialidad de dispersión en estas áreas, debido al flujo poblacional constante⁽³⁶⁶⁾. De manera diferente ocurre en las áreas de salud más periféricas (Capri, Eléctrico y Managua), donde el flujo humano disminuye, y por consiguiente, la dispersión de los VDENS.

Lo descrito anteriormente soporta, de forma coherente, las diferencias en la frecuencia de aparición de VDEN entre las áreas durante septiembre/2013 y julio/2014. De manera general, se aprecia una correspondencia entre los territorios que manifestaron mayor variedad de serotipos de dengue en mosquitos (Mantilla, Párraga, Los Pinos, Grimaú y Capri), con aquellos en los que se encontró más frecuentemente el virus en sus poblaciones inmaduras de *Ae. aegypti* durante el periodo de estudio (Los Pinos, Grimaú, Mantilla y Párraga).

La asimetría en la distribución de la TV de los VDENS en las áreas de salud de Arroyo Naranjo durante 2013-2014 sugirió posibles habilidades diferenciales de las poblaciones de mosquito para transmitir horizontal y/o verticalmente los virus. Poblaciones diferentes de una misma especie son capaces de manifestar diferentes grados de susceptibilidad y transmisión a un mismo virus, y viceversa^(289, 368, 369), determinado en gran medida genéticamente⁽³⁷⁰⁻³⁷³⁾. La heterogeneidad de la TV también induce a pensar en una posible adaptación mutua entre las poblaciones de mosquitos y las cepas virales que favorezca la TV en aquellas que se encuentran más expuestas a los virus (a partir de la historia epidemiológica de cada lugar)⁽³⁷⁴⁾.

Sin embargo, el tamaño de muestra proveniente de cada área no fue uniforme y los sitios con poca cantidad de *Ae. aegypti* positivos a VDENS coincidieron con aquellos con inferior tamaño de muestra examinada (Eléctrico y Managua) (tabla 3.1). Es de esta forma que la menor aparición de TV también pudo ser consecuencia del examen de un menor número de estadios inmaduros debido a la menor presencia de mosquitos y/o una colecta deficiente en estos territorios.

Una vez comprobada la habilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* de todas las áreas de salud de Arroyo Naranjo para transmitir verticalmente los VDENS; el estudio desarrollado durante 2018-2019 profundizó en algunos de los aspectos antes señalados

con el fin de discernir las posibles causas de la heterogeneidad de la TV entre sitios. Teniendo en cuenta estos elementos, se seleccionaron dos territorios urbanos, de extensión territorial y densidad poblacional comparables, pero con historial epidemiológico contrastado, medido a través del registro de casos de dengue entre 2010-2017⁽³³⁴⁾ (Pasteur, baja transmisión y Párraga, alta transmisión). El uso de igual cantidad de ovitrampas para la colecta de los huevos de *Ae. aegypti* permitió estimar y comparar la abundancia relativa de las poblaciones del vector entre sitios.

Durante este segundo periodo (2018-2019), se encontró que las áreas Pasteur y Párraga, a pesar de su similar grado de urbanización, densidad y movimiento poblacionales, mostraron también un patrón significativamente asimétrico en la distribución de la TV de los VDENS, pero una distribución análoga en la TV de VZIK. En Párraga, particularmente, la TIM por VZIK fue significativamente menor que la de los VDENS, lo que pudiera guardar relación con una más larga historia de asociación y co-evolución de las poblaciones locales de *Ae. aegypti* con los VDENS que con VZIK^(189, 260). En esta ocasión se verificó que la abundancia relativa de las poblaciones de *Ae. aegypti* no mostraron diferencias significativas entre los sitios, por lo que la limitada TV de los VDENS en el área de salud Pasteur no estuvo ligada a ese factor. En este caso, las diferencias entre las áreas de estudio se concentraron en sus historias epidemiológicas en relación a la acumulación de casos humanos de dengue, que pudiera deberse a una capacidad diferencial de sus poblaciones de *Ae. aegypti* para transmitir horizontal y/o verticalmente estos virus.

De forma global, en ambos periodos de estudio, las TIM manifestaron un comportamiento fluctuante en el tiempo. Algunas investigaciones indican que las tasas de infección por arbovirus en mosquitos, normalmente exhiben una variabilidad espacial y temporal considerables⁽³⁷⁵⁾. También se plantea que las TIM obtenidas usualmente en los estudios de TV son bajas (<10) incluso en áreas con alta incidencia de estos virus⁽³⁴⁾. Al valorar el comportamiento de las TIM tanto por VDENS como por VZIK durante 2018-2019, llama la atención que con excepción de Párraga/VDENS, las TIM totales fueron bajas (≈ 1) (tabla 3.2). Sin embargo, de manera general, altos valores de TIM por VDENS se encontraron frecuentemente en áreas específicas (Mantilla, Párraga (en ambos periodos), Grima y Los Pinos), lo cual puede sugerir una intensa circulación

viral en la población vectorial de esos territorios. Elevadas TIM (48,2 y 31,9) se registraron en estudios de campo realizados en países endémicos a VDENS como Filipinas e Indonesia^(40, 376). Se postula que esta vía de transmisión conserva y favorece la circulación de estos virus en áreas endémicas^(39, 42), todo lo cual sugiere que la TV no solo es causa, sino también consecuencia de la persistencia de los VDENS en una región determinada.

Si bien la insuficiente duración de las series temporales utilizadas en ambos estudios nos impide hacer correlaciones entre la ocurrencia de la TV de los VDENS y VZIK y las épocas del año, un metaanálisis encontró que los mosquitos del género *Aedes* manifiestan mayores tasas de infección vertical efectiva en la naturaleza bajo condiciones de clima seco comparado con climas templado o tropical⁽¹⁾. Esto sugiere que en época de seca (noviembre-mayo) la TV podría verse favorecida en el contexto cubano y apoya la hipótesis de que esta vía de transmisión constituye un mecanismo de mantenimiento de la circulación viral en temporadas adversas para la TH⁽¹⁾.

Algunos estudios plantean que las tasas de TV varían significativamente entre los cuatro serotipos de dengue^(1, 34). Así se postula que VDEN-1 manifiesta las mayores tasas de TV, seguido por VDEN-4 y, sin diferencia entre ellos, VDEN-2 y VDEN-3⁽¹⁾. Varias investigaciones comprobaron que, similar a lo que ocurre en otros sistemas hospedero-patógeno, la interacción entre los genotipos de *Ae. aegypti* y los arbovirus (interacción genotipo-genotipo) determina el comportamiento del mosquito en relación al virus y viceversa^(373, 377, 378). La interacción entre una población de mosquitos y una cepa viral podría establecer tasas de TV propias de este par y diferentes para otro sistema *Ae. aegypti*-virus. Este fenómeno pudo influir en el resultado de encontrar mayores proporciones de individuos de *Ae. aegypti* en estadios inmaduros infectados con VDEN-1 (en el periodo 2013-2014) y VDEN-2 (en el periodo 2018-2019).

En ambos periodos, se encontraron grupos de *Ae. aegypti* multi-infectados con más de un VDEN, concentrados en las áreas que exhibieron mayor variedad de serotipos, lo cual es esperado. Sin embargo, no se registró la combinación VDEN-VZIK en grupos de mosquitos durante el periodo 2018-2019. La co-detección de arbovirus/serotipos diferentes en grupos de mosquitos del género *Aedes* colectados en el terreno se informó en otras latitudes^(40, 379-382). La aparición de más de un VDEN en los grupos pudo estar

dada por la presencia de diferentes ejemplares infectados con serotipos diferentes; o por la existencia de individuos co-infectados por varios serotipos. Resulta llamativa la presencia de más de un serotipo en grupos de en larvas y pupas colectadas en el mismo sitio de cría/ovitrapa. Se describe que la hembra de *Ae. aegypti* deposita la totalidad de los huevos de un ciclo gonadotrófico en varios sitios de cría⁽³⁸³⁾ con una preferencia de oviposición en recipientes con presencia de larvas de su especie⁽³⁸⁴⁾. Este comportamiento favorece la dispersión de *Ae. aegypti* y con él, de los virus, al igual que la mezcla de individuos provenientes de diferentes madres. De esta manera, no sería raro encontrar en el mismo sitio de cría, individuos infectados con distintos serotipos. Por otra parte, Angel *et al.*, 2015⁽³⁹⁾ exploraron la presencia de los VDENs en *Ae. aegypti* provenientes de zonas endémicas en la India, y encontraron que casi el 80% de los mosquitos estuvo infectado verticalmente con varios serotipos. Sin embargo, experimentos en los que se infectaron la línea celular C6/36⁽³⁸⁵⁾ y mosquitos *Ae. aegypti*⁽³⁸⁶⁾ con VDEN-2 y VDEN-4 demostraron que existe competencia inter-serotípica. Como consecuencia, la infección simultánea disminuye los títulos virales de ambos serotipos⁽³⁸⁵⁾ y la presencia de la infección con un serotipo limita la infección por un segundo⁽³⁸⁶⁾. Teniendo en cuenta las evidencias anteriores, la capacidad de una hembra de *Ae. aegypti* para transmitir al unísono más de un serotipo viral resulta controversial. De cualquier forma, las co-infecciones con varios serotipos de dengue en humanos se documentan principalmente en las regiones donde este virus es hiperendémico⁽³⁸⁷⁾, y entre los factores de riesgo para padecerla se destaca la elevada densidad de los mosquitos del género *Aedes*⁽³⁸⁷⁾. Independientemente de las vías por las que apareció más de un VDEN en grupos de mosquitos examinados, este hecho ratifica los rasgos de endemidad en la circulación de estos virus en los territorios estudiados y con ello el incremento del riesgo de padecer formas graves de la enfermedad^(163, 388).

Durante 2018 se identificaron manzanas en el área de salud Párraga en las que se colectaron huevos infectados periódicamente con VDEN-2. Si bien es posible que mediante la alternancia entre humanos y vectores (transmisión horizontal) el virus pueda mantenerse en un lugar determinado, no se puede descartar la posibilidad de que VDEN-2 se transmita verticalmente mediante sucesivas generaciones como se describió anteriormente en ensayos de laboratorio para las especies *Ae. aegypti*⁽²⁷⁾ y *Ae.*

albopictus⁽³⁸⁹⁾. La existencia de criaderos permanente en estas manzanas, explicaría la presencia constante de mosquitos que pudieron garantizar la transmisión tanto horizontal como vertical (inclusive por varias generaciones) de VDEN-2, permitiendo la circulación sostenida del virus en las poblaciones de vectores y hospederos de esos sitios. Otro elemento que se considera crucial para el mantenimiento de los arbovirus por largos periodos, es la característica de los huevos de *Ae. aegypti* de resistir la desecación y permanecer viables por meses hasta que condiciones favorables les permitan la eclosión⁽¹⁾. Un estudio realizado en *Ae. albopictus* demostró que VZIK “sobrevivió” y se replicó en huevos en diapausa infectados verticalmente⁽³⁹⁰⁾. Los mosquitos pueden fungir como reservorios de arbovirus, los que puede permanecer por tiempo prolongado en las poblaciones mediante la transmisión intervectorial (TV, TVN y la depredación de larvas infectadas)⁽³⁹¹⁾.

Las secuencias parciales de los VDENS y VZIK obtenidas a partir de *Ae. aegypti* colectados en el terreno, permitieron aportar información no solo sobre los virus circulantes, sino además, sobre los genotipos virales, posibles orígenes y relaciones filogenéticas. Así, las tres secuencias nucleotídicas de VDEN-1 obtenidas (D1_Pga_2013, D1_LP_2014 y D1_Grm_2014) pertenecieron al genotipo V (Americano/Africano), que se ha identificado en la mayoría de los aislamientos colectados en la región latinoamericana durante la década de los 70 y hasta la actualidad ⁽³⁹²⁾. Este genotipo se detectó también en dos pacientes cubanos de Guantánamo/2010 y La Habana/2013, aunque este último se informó como un caso de dengue importado desde Barbados ⁽¹⁹⁵⁾.

Los aislamientos de VDEN-1 cubanos secuenciados en el presente trabajo formaron un subgrupo independiente, y se relacionan genéticamente con virus que circularon previamente en Centro América (Nicaragua/2005, 2009 y México/2007) que marcan su posible origen. La construcción filogenética realizada por Díaz ⁽¹⁹⁵⁾, con secuencias del gen *e* de un aislamiento obtenido de un paciente en Guantánamo (2010), reveló su cercanía con aislamientos de Venezuela (2007), Puerto Rico (2006) y Nicaragua (2005). Estos resultados revelan concordancia con los del presente estudio en cuanto al posible origen y relación genética del VDEN-1 detectado en mosquitos en Arroyo Naranjo (2013 y 2014).

Por su parte, la secuencia del VDEN-3 (D3_Mlla_2013) se agrupó dentro del genotipo III, de la misma manera que aislamientos cubanos obtenidos de pacientes de La Habana/2009, Santiago de Cuba/2010 y 2011, Camagüey/2011 y Sancti Spíritus/2014 que se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK, según demuestra un estudio realizado en 2014⁽¹⁹⁵⁾. La secuencia D3_Mlla_2013 se relacionó genéticamente con virus que circularon en el Caribe (Venezuela/2001 y Puerto Rico/2006). Esto concuerda con el origen sugerido por Díaz ⁽¹⁹⁵⁾[14] para el VDEN-3 que circuló en Cuba entre 2010 y 2014. La divergencia nucleotídica (2,7%) observada entre la secuencia cubana y las foráneas sugiere una posible evolución *in situ* de este virus que circuló, al menos, por siete años en contextos geográficos diferentes. Desafortunadamente, la ausencia de otras secuencias cubanas del gen *c-prm*, impide hacer análisis más profundos sobre la dinámica de transmisión y evolución viral.

La secuencia nucleotídica del VDEN-4 (D4_Mlla_2013) perteneció al genotipo II al igual que otros aislamientos obtenidos de pacientes sintomáticos en el período 2010-2014 en La Habana, Las Tunas, Santiago de Cuba y Guantánamo⁽¹⁹⁵⁾. Este genotipo circula en la región Latinoamericana desde 1981, y se considera tiene un origen asiático⁽³⁹³⁾. La secuencia cubana se agrupó en un clado junto a aislamientos provenientes de Venezuela, Puerto Rico, Colombia y Brasil. Dentro de este, mostró una cercana relación genética con las secuencias brasileñas obtenidas en los años 2012 y 2013 a partir de sueros humanos y manifestó un 98,8% de similitud nucleotídica con un aislamiento obtenido de un paciente en Jundiaí, São Paulo. Una secuencia del genoma completo del virus detectado en nuestro estudio podría confirmar esta hipótesis. Esta relación sugiere que en ese país suramericano estuvo el posible origen del virus circulante en Arroyo Naranjo. Análisis filogenéticos previos basados en el gen *e* de aislamientos de VDEN-4 colectados en sueros humanos en varias ciudades cubanas en el período de 2010-2014, revelaron su cercana relación genética con VDEN-4 colectados en Venezuela en varios años, sugiriendo su origen en ese país⁽¹⁹⁵⁾. Sin embargo, en la construcción filogenética realizada en aquel estudio no se incluyó ninguna secuencia proveniente de Brasil.

Esa aparente contradicción con los resultados de la presente investigación pudiera estar relacionada con múltiples introducciones de VDEN-4 en Cuba en los últimos años. Situaciones como esta se observaron previamente en varias regiones del mundo, con

este y otros serotipos^(195, 394). De cualquier manera, la ausencia de secuencias cubanas adicionales del gen *c-prm*, impide profundizar en esta hipótesis.

La secuencia nucleotídica del VZIK (Z_Pga_2019, Número de acceso: PP759388) obtenida perteneció al genotipo asiático, linaje americano. La secuencia cubana se asoció más estrechamente con secuencias de Martinica y Guadalupe de los años 2015 y 2016. Este resultado concuerda con lo hallado previamente por Grubaugh *et al.*, 2019⁽³⁶⁰⁾ en un estudio realizado con nueve secuencias de viajeros provenientes de Cuba. La mencionada investigación encontró que los genomas cubanos del VZIK se agruparon con otros de México, Centro-América y el Caribe, con lo que hipotetizaron que la epidemia en la isla fue una continuación de la epidemia en Las Américas y no introducciones de los brotes que estaban teniendo lugar en Asia. Basados en la ubicación de los genomas del virus en la filogenia construida, los autores observaron evidencias de introducciones múltiples en Cuba: una de Centro América, y tres del Caribe⁽³⁶⁰⁾.

En conclusión, la comprobación de la TV de los cuatro VDENS y el VZIK en poblaciones naturales de *Ae. aegypti* de La Habana, sugieren que esta vía de transmisión ocurre con frecuencia no despreciable en algunos de los territorios estudiados. El monitoreo de la TV en el terreno y el control de las poblaciones inmaduras de *Ae. aegypti*, portadoras de virus y potenciales transmisoras, constituye un objetivo fundamental en la lucha contra la re-emergencia y mantenimiento de los virus transmitidos por *Aedes*⁽³⁹⁵⁾.

4.2 Competencia vectorial de poblaciones de *Aedes aegypti* de La Habana a arbovirus.

El conjunto de las evidencias encontradas en el estudio realizado durante 2018-2019, nos planteó una nueva interrogante con respecto a la habilidad de las dos poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas para transmitir tanto horizontal como verticalmente los VDENS y VZIK. Una habilidad diferencial de PTE y PRG para diseminar y transmitir un virus sobre otro sería posible si estas poblaciones presentaran genofondos diferentes, ya que el fenotipo susceptible/resistente a la infección en mosquitos está considerablemente determinado genéticamente⁽³⁷⁰⁻³⁷³⁾.

Las especies de mosquitos implicadas en la transmisión de patógenos han sido históricamente estudiadas en Cuba^(396, 397); sin embargo, las potencialidades de *Ae.*

aegypti para transmitir los VDENS, VCHIK y VZIK no se exploraron hasta ahora. El presente estudio verificó, por primera vez, que *Ae. aegypti* de La Habana son capaces de transmitir estos arbovirus de trascendental importancia médica desde los 3 dpe (para VCHIK) y 7 dpe (para VDEN-1 y VZIK).

Ninguna de las muestras de saliva examinadas de las hembras de la población PTE expuestas a VZIK resultaron positivas. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la población PRG fue capaz de transmitir los flavivirus VDEN-1 y VZIK desde los 7 dpe, lo que ratifica a *Ae. aegypti* como vector en las epidemias causadas por estos virus en Cuba⁽²¹⁾. A pesar de la susceptibilidad demostrada por esta especie a la infección con los flavivirus, la TT obtenidas a los 7 y 14 dpe para VDEN-1 y VZIK fueron bajas. Estudios anteriores evaluaron la CoV de poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes partes de mundo a cepas de VZIK pertenecientes al genotipo asiático (el mismo de la cepa empleada en este estudio), y también remarcaron el bajo potencial transmisor de esta especie^(289, 368, 398, 399), lo cual contrasta con la rápida dispersión de VZIK por el continente americano. La gran cantidad de población humana susceptible a VZIK se sugirió como una explicación para balancear el bajo potencial transmisor encontrado en las poblaciones de *Ae. aegypti* a este virus⁽³⁹⁸⁾.

Dado el registro histórico de casos de dengue superior en Párraga con respecto a Pasteur, y comprobada una TV de los VDENS mayor en el primer sitio que en el segundo (*i.e.* $TIM_{VDENS}(Párraga)=9,8$; $TIM_{VDENS}(Pasteur)=1,3$), se esperaba que las tasas de transmisión (TT) (horizontal) determinadas experimentalmente para VDEN-1 fueran mayores en PRG que PTE. De igual forma, teniendo en cuenta el significativo número de brotes y epidemias de VDENS que tienen lugar en Cuba (revisado en⁽²¹⁾), esperábamos encontrar TT de VDEN-1 más elevadas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los VDENS incluyen otros tres serotipos y la CoV de las poblaciones cubanas a ellos pudieran diferir como se observó en otros estudios^(400, 401). Investigaciones futuras debieran evaluar la CoV de mosquitos cubanos a los otros serotipos de dengue. Tampoco se puede descartar que la CoV es dependiente de los genotipos del vector y el patógeno⁽³⁷³⁾, por lo que otras combinaciones *Ae. aegypti*/VDEN-1, pudieran exhibir resultados distintos.

El otro virus transmitido por *Aedes* causante de epidemias en Las Américas en los años recientes, es VCHIK. Resulta interesante que, aunque este alfavirus se encuentra

activamente circulando en la región, no se registra su transmisión autóctona hasta el momento en La Habana, a pesar de la importación de casos de chikungunya en Cuba⁽²¹⁾. Los resultados obtenidos demostraron que las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas fueron capaces de transmitir VCHIK (aunque con bajas TT) tan temprano como tres días después de haber ingerido el virus (en el caso de PTE), lo cual sugiere que la ausencia de circulación local no está ligada a la incompetencia de los vectores locales a este alfavirus. Cortos PIE como los encontrados ponen a prueba la implementación de estrategias de control vectorial, favorecen la rápida propagación de los casos autóctonos primarios y pueden conducir a epidemias explosivas. De hecho, el PIE es considerado un factor crítico en la determinación de la eficiencia de transmisión por un vector^(233, 402). Estos resultados alertan sobre el riesgo latente de introducción y rápida dispersión del alfavirus en la isla por las poblaciones de mosquitos cubanos y los elevados niveles de población humana susceptible.

Es importante señalar que la transmisión de arbovirus en la naturaleza no se evalúa exclusivamente a través de los parámetros de CoV. La contribución de la CoV a la CaV de una población de mosquitos, aunque esencial, es menos influyente cuando se compara con otros factores eco-biológicos tales como la antropofagia, supervivencia del vector, su tasa de picada, entre otros⁽²³³⁾. Por tanto, la influencia de estos últimos factores puede equilibrar la baja CoV de las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas para los arbovirus ensayados y aumentar su CaV, lo cual explica por qué “vectores poco eficientes” pueden provocar epidemias⁽⁴⁰³⁾. En Cuba, a pesar de los esfuerzos por controlar las poblaciones de vectores, *Ae. aegypti* es una de las especies de mosquitos más abundante y extendida⁽⁴⁰⁴⁾. Esa distribución y abundancia pueden contrarrestar las bajas tasa de transmisión detectadas facilitando brotes y epidemias de los VDENS, VZIK y VCHIK.

El diseño experimental y las técnicas empleadas en los ensayos de laboratorio también pueden impactar la estimación de los parámetros de CoV. Los sistemas de alimentación artificial (como el usado en el presente estudio) son menos eficientes en asegurar la infección y diseminación en el mosquito si se comparan con el uso de modelos animales^(399, 405), lo que puede subestimar los niveles de CoV. Por esta razón, se usaron en la alimentación artificial títulos virales (10^7 TCID₅₀/mL para VCHIK y VZIK, y 10^7 uff/mL para VDEN-1) más altos que las viremias típicas observadas en los hospederos

naturales^(399, 405-407). Por otra parte, los virus congelados por largo tiempo (como el utilizado en el presente estudio) aseguran una infección menor que la provocada por el mismo título de un virus fresco (revisado en⁽⁴⁰⁸⁾). Adicionalmente se plantea que los métodos de colecta de saliva *in vitro* subestiman la cantidad de virus excretado durante la alimentación *in vivo*⁽⁴⁰⁹⁻⁴¹¹⁾ y la sensibilidad de la titulación viral usando ensayos de cultivos celulares es inferior que la inoculación de virus en ratones, por ejemplo, tal como demostraron Smith *et al.*, 2005⁽⁴¹⁰⁾. Por último, es probable que las TD y TT para los flavivirus ensayados fueran superiores a dpe tardíos como informan otros estudios (por ejemplo, a los 21 dpe)^(287, 289), sin embargo, ese tiempo no se consideró en nuestro trabajo dado que la esperanza de vida media de las hembras de *Ae. aegypti* en el terreno es generalmente más corta ($\approx 10-15$ días)^(412, 413). Armstrong *et al.*, 2020⁽⁴¹⁴⁾ demostraron, mediante ensayos de CoV, que una segunda alimentación sanguínea no infecciosa durante el período de incubación del virus en el vector, acortó significativamente los PIE de *Ae. aegypti* expuestos a VZIK, VDEN-2 y VCHIK, a partir del incremento de velocidad de diseminación dado por el aumento de la permeabilidad de la membrana basal que rodea el intestino en el mosquito. De esta manera, aun con bajas TT, PIEs acortados darían lugar a un aumento significativo del número reproductivo básico (R_0), es decir, de la CaV de esta especie. Estos resultados explicarían cómo con una CoV relativamente baja en ensayos de laboratorio con alimentación única (como los nuestros), *Ae. aegypti*, especie con hábitos de picador persistente, puede generar y mantener epidemias explosivas en la naturaleza⁽⁴¹⁴⁾. Las bajas TT pudieron estar causadas, en parte, por estos factores, más que por reales rasgos intrínsecos ligados a una limitada habilidad de transmisión en los mosquitos estudiados.

Ambas poblaciones de *Ae. aegypti* exhibieron altas TI y TD para VZIK (TI>79% y TD>65% a 14 dpe) y VCHIK (TI>95% y TD>86% a 14 dpe), similar a datos informados anteriormente en Las Américas^(368, 398, 415-417), lo que sugiere una elevada permeabilidad de las barreras de infección y escape del intestino medio. Opuestamente, las dos poblaciones fueron menos susceptibles a VDEN-1 que a los otros virus, lo que resalta una mayor eficiencia de la barrera de infección al intestino medio y/o la inmunidad del mosquito para evitar la replicación viral^(369, 418). A pesar de ello, la diseminación a los 14 dpe mostró una eficiencia similar en ambas poblaciones para los dos flavivirus, con lo

que, en principio, posibles habilidades diferenciales para transmitir horizontal y verticalmente estos virus, no están determinadas por diferentes niveles de diseminación de los virus en ambas poblaciones de mosquito. Con relación a la transmisión, las bajas TT observadas sugieren, de forma general, que las barreras de las glándulas salivares juegan el papel más importante en limitar la excreción de virus, tal como se propuso anteriormente^(368, 369, 415-417, 419, 420). Este fenómeno resalta la importancia de evaluar la transmisión en los ensayos de CoV, ya que infecciones bien diseminadas no siempre van acompañadas de elevadas tasas de transmisión.

Las bajas TT estimadas en las poblaciones de mosquitos examinadas pudieran sugerir la participación de otros vectores, además de *Ae. aegypti*, en la dinámica de transmisión de estos arbovirus en el contexto nacional. *Aedes albopictus* (registrado en Cuba desde 1995⁽⁴²¹⁾) pudiera estar involucrado en la transmisión natural de estos flavivirus, como se informó en otros sitios (revisado en⁽⁴²²⁾). Recientemente se comprobó la TV de los VDENs en cinco de 16 grupos de *Ae. albopictus* colectados en 2019 en el municipio Arroyo Naranjo (uno de ellos proveniente del área de salud Párraga)⁽⁴²³⁾, lo que sugiere una posible vinculación de esta especie en la transmisión de los VDENs en La Habana. No obstante, la CoV de poblaciones locales de *Ae. albopictus* no ha sido explorada, lo que impide realizar afirmaciones más categóricas. Sin embargo, dado que este mosquito es más generalista que *Ae. aegypti*⁽⁴²⁴⁾ es menos probable que se alimente de humanos como mínimo dos veces para permitirle la adquisición y transmisión de un arbovirus⁽⁴²⁵⁾. En años recientes se observó un incremento en la domiciliación de este culicido, aunque continúa mayormente confinado al espacio periurbano⁽⁴²⁶⁾, lo que limita su contacto con grandes poblaciones humanas⁽⁴⁰⁴⁾ y lo convierte en un vector menos significativo en la transmisión de estos arbovirus en el contexto cubano actual. Una muestra de eso son los resultados de las colectas de huevos de *Aedes* spp. realizadas durante 2018-2019 en las viviendas de Párraga. Tal como se expuso en el capítulo 3, solo el 0,2% de los mosquitos colectados, fueron *Ae. albopictus* (sección 3.1.2).

A la luz de la evidencia experimental presentada, donde el mismo vector puede transmitir (con capacidad similar) los tres arbovirus ensayados, pudiéramos preguntarnos ¿por qué la emergencia de VCHIK de 2014-2015 en Las Américas, no provocó brotes en La Habana, mientras que la emergencia de VZIK sí condujo a una

epidemia en todo el país? La vigilancia activa y cuarentena de los casos sintomáticos importados pudo jugar un rol muy importante en la modelación del escenario epidemiológico en Cuba. Es necesario recordar que en las infecciones por VCHIK la proporción de asintomáticos (4-28%)⁽¹³⁵⁾ es significativamente menor que en las infecciones por VZIK (hasta 80%)⁽¹⁶⁾. Antes de 2013, casos importados de cikungunya no condujeron a una transmisión autóctona significativa en algunos territorios (revisado en⁽¹³⁵⁾). Entre 2006 y 2011, algunos países registraron casos importados de chikungunya (por ejemplo, Brasil, Guyana Francesa, Guadalupe, Martinica, Australia), pero estos no causaron la dispersión del alfavirus en esos territorios en aquel momento, incluso en presencia de poblaciones de *Ae. aegypti*. Los autores atribuyen este escenario “en parte a la vigilancia activa de los casos importados, pero señalan además que la dispersión del virus estuvo obstaculizada por razones entomológicas o ecológicas indeterminadas”⁽¹³⁵⁾. Otras hipótesis podrían ser una circulación silente o diagnóstico erróneo de las infecciones con VCHIK, aunque esa explicación es menos plausible, ya que habitualmente las personas infectadas con VCHIK y que manifiestan síntomas clínicos requieren atención médica⁽¹⁷⁰⁾, lo cual descubriría fácilmente la circulación del virus. Los estudios de CoV constituyen herramientas valiosas en la determinación de las potencialidades vectoras de una especie, así como en la estimación de parámetros para el estudio de las dinámicas de transmisión por vectores^(415, 427, 428). Ante el riesgo constante que representan la presencia en Cuba de más de 70 especies de mosquitos y otros artrópodos de conocidas potencialidades vectoras⁽²¹⁷⁾, así como los constantes eventos de emergencia y re-emergencia de patógenos a nivel global⁽⁴²⁹⁾, resultaría estratégica la creación de capacidades en Cuba para el desarrollo de este tipo de estudios en el marco de las voluntades nacionales para implementar el enfoque “Una salud”⁽⁴³⁰⁾. En conclusión, la evaluación de la competencia vectorial de mosquitos de PTE y PRG demostró la habilidad similar de estas poblaciones y en general, de *Ae. aegypti*, para transmitir los VDENS y VZIK en Cuba. Además, se comprobó la potencialidad de estas poblaciones para transmitir VCHIK, lo cual constituye una alerta sobre el riesgo real de dispersión de este alfavirus en el país. Estos resultados, junto a la elevada abundancia y amplia distribución de esta especie en los sitios urbanos a lo largo de la isla, subrayan la

importancia del control de *Ae aegypti* y la vigilancia de los arbovirus para prevenir futuros brotes.

4.3 Transmisión vertical e infección filial por los virus dengue-1, chikungunya y Zika en las poblaciones PTE y PRG

Las evidencias reunidas hasta ahora sugieren que las diferencias en la TV natural de los VDENs entre los sitios de estudio, no se debió a una mayor abundancia de *Ae. aegypti* en Parrága que en Pasteur, ni a habilidades incrementadas de PRG para infectarse, diseminar y transmitir horizontalmente, al menos, VDEN-1. De esta forma, la evaluación de la capacidad de ambas poblaciones de culícidos para transmitir verticalmente los virus podría esclarecer el panorama. Los estudios experimentales de TV de arbovirus son escasos y heterogéneos (revisado en⁽³⁴⁾), por lo que los resultados obtenidos fertilizan un campo de investigación poco explorado.

La TV natural de los VDEN-1, VCHIK y VZIK en *Ae. aegypti* se documenta en disímiles lugares del mundo^(31, 32, 39, 41, 431-434), aunque, hasta donde conocemos, esta es la primera vez que se evalúa simultáneamente la habilidad de transmisión de estos tres arbovirus en *Ae aegypti* a su descendencia. Nuestros resultados ratifican la capacidad observada en las poblaciones PTE y PRG para transmitir verticalmente de forma natural los VDENs y VZIK en el terreno, así como el potencial para transferir VCHIK a su progenie.

Resultados experimentales publicados muestran alta variabilidad en la TV de los flavivirus^(28, 317). Sánchez-Vargas *et al.*, 2018⁽³¹⁷⁾, en experimentos con *Ae. aegypti*-VDEN-2, informaron TTVs en el 2^{do}CG que oscilaron entre 48-52%, en tanto Castro *et al.*, 2004⁽⁴³⁵⁾, usando el mismo modelo experimental, observaron valores de 27%. Otras infecciones de *Ae. aegypti* con VDEN-1, produjeron TTVs de 0%, 3% y 8%⁽⁴³⁶⁻⁴³⁸⁾. Por otra parte, ensayos de laboratorio con el mismo vector y VZIK, obtuvieron TTV de 0-3% en el 1^{er}GC^(46, 433) y valores de 3%⁽⁴³³⁾, 21%, 76% y 100%⁽²⁸⁾, en el 2^{do}CG. Las TTVs de VDEN-1 y VZIK obtenidas en nuestro estudio, estuvieron por encima de las TTV media antes referidas, lo que sugiere una habilidad superior de transmisión de estos virus a la descendencia en las poblaciones evaluadas.

La proporción de descendientes infectados por TV también registra variaciones entre los estudios. En el modelo *Ae. aegypti*-VDEN-2, las TIFM encontradas en el 1^{er}CG fue

0,5%⁽³¹⁷⁾, mientras que en el 2^{do}CG alcanzaron valores de 1-5%⁽³¹⁷⁾ y 5%⁽⁴³⁵⁾. Por otro lado, *Ae. aegypti* infectados con VDEN-1 dejaron el 0,13% de su descendencia infectada⁽⁴³⁶⁾, mientras que en infecciones con VDEN-4 no sobrepasaron el 0,14%⁽⁴³⁹⁾. La mayoría de los ensayos con *Ae. aegypti* y VZIK documentan TIFM que oscilaron entre 0,49-9%^(35, 43, 433, 440-442) mayormente en el 2^{do}CG, aunque estudios excepcionales estimaron TIF de 9-66%⁽²⁸⁾ y 6-10%⁽⁴⁶⁾.

La poca cantidad de mosquitos que sobreviven hasta el 2^{do}CG y dejan descendencia impacta en la estimación de los parámetros TV, lo cual se reconoce como una debilidad/limitación en los estudios de TV. Este hecho hace que en determinadas ocasiones los índices de TV deban ser interpretadas con cautela^(34, 437).

Múltiples factores influyen la eficiencia de la TV de flavivirus y pueden hacer variar sus índices de un ensayo a otro^(317, 433). Entre estos elementos se encuentran los asociados al diseño experimental (método de infección, temperatura de cría de mosquitos, intervalos entre la infección inicial y la segunda toma de sangre, sensibilidad de las técnicas de detección viral, etc) y los dependientes de los rasgos biológicos del modelo de estudio empleado (especie y población de mosquito, tiempo de colonización de la misma, los virus, sus pases, el genotipo viral, origen geográfico, fase de desarrollo del mosquito examinada, fecundidad y fertilidad de la población, tamaño de la muestra, ciclo gonadotrófico, entre otros)^(27, 241, 308, 389, 443-446).

Estudios previos encontraron baja o ninguna TV en el 1^{er}CG^(1, 317, 389, 433, 447), probablemente debido a la pobre diseminación viral hacia los tejidos reproductivos antes de la producción y puesta del primer lote de huevos (entre tres y ocho días generalmente)^(317, 433), y/o la disminuida permeabilidad al virus en ovarios nulíparos durante la ovogénesis^(29, 317, 433). Sin embargo, TTV y TIFM no despreciables se estimaron en todas las combinaciones *Ae. aegypti* – virus, excepto en PRG-VDEN-1 en el 1^{er}CG. Manuel *et al.*, 2020⁽²⁸⁾ comprobaron que las TTV y TIF de VZIK en *Ae. aegypti* aumentaron en la medida que se incrementó el tiempo de incubación extrínseca del virus y decrecieron del segundo al tercer ciclo gonadotrófico; con lo que concluyeron que más que el número de CG, el tiempo de exposición de los ovocitos al virus en los tejidos reproductivos es decisivo en la TV. En nuestro caso, la oviposición del 1^{er}CG rondó los 8 dpe, tiempo relativamente prolongado para la primera puesta de huevos, lo

que pudo favorecer la exposición de los ovocitos a los virus y con ello mayor oportunidad de infección en la descendencia.

Estudios experimentales realizados en los modelos *Ae. aegypti*-VDEN-2 y *Ae. aegypti*-VZIK comprobaron la infección de los ovarios (oviductos y ovocitos) tras la diseminación del virus al hemocele del mosquito^(317, 433). Sin embargo, observaron que solo una fracción menor de hembras con ovarios infectados produjo progenie infectada⁽⁴³³⁾, por lo que especularon que probablemente los ovocitos no se infecten comúnmente, y solo aquellas madres con ovocitos infectados, transmiten verticalmente el virus. Al igual que existen barreras a la infección de las glándulas salivares, se propone que la infección de los ovarios y/o los ovocitos por arbovirus está limitada por factores/barreras a ese nivel^(26, 433). Además, recientemente se describió que *Ae. aegypti* transmite a su progenie una memoria inmunológica antiviral a través del mecanismo conocido como estimulación inmunitaria transgeneracional (en inglés *transgenerational immune priming* (TGIP)). Como consecuencia la descendencia queda protegida de la infección con el mismo arbovirus por varias generaciones⁽⁴⁴⁸⁾. Sin embargo, se observó que ese grado de protección muestra una variabilidad inter-individuo sustancial^(448, 449). Aunque las vías y mecanismos inmunológicos que operan en la TV de arbovirus en mosquitos son desconocidos, la TGIP parecería ser una posible pista a seguir para encontrar la respuesta.

La TV en mosquitos ocurre a través de dos mecanismos: (i) la transmisión transovárica (TOT) donde el virus infecta el germario en la ovariola y garantiza tasas de TV más altas y una diseminación extensiva⁽⁴⁵⁰⁾ y (ii) el mecanismo trans-huevo (considerado menos eficiente que la TOT), donde el virus infecta el huevo durante la oviposición⁽³⁰²⁾. Dadas las frecuentes bajas tasas de infección por TV, se hipotetiza que este último mecanismo tiene lugar para los flavivirus⁽³⁰²⁾. No obstante, patrones consistentes con infecciones estabilizadas que alcanzan altas tasas de TV se documentaron para VDEN-1 en *Ae. albopictus*⁽³⁸⁹⁾, así como para VDEN-3⁽²⁷⁾ y VZIK⁽²⁸⁾ en *Ae. aegypti*, lo que sugiere que esa amplia y eficiente diseminación en la progenie puede ser esperada también en estos casos⁽¹⁾. De hecho, varios estudios sugieren que también puede ocurrir la colonización del germario y con ello la infección de mayor cantidad de miembros de la progenie, como ocurre con los orthobunyavirus^(1, 28). Sin embargo, son escasos los trabajos que indagan

en estos mecanismos para las combinaciones *Ae. aegypti*-flavivirus y *Ae. aegypti*-alfavirus^(317, 433), por lo que esta es una temática prácticamente virgen. Así de inexplorado resulta el tropismo viral en la descendencia infectada, al igual que las barreras (tanto anatómicas, fisiológicas como inmunológicas) que encuentra el virus a la colonización del nuevo insecto. Un modelo prometedor para el estudio de esta vía de transmisión lo constituye el sistema *Ae. aegypti*- virus específicos de insectos (ISVs en inglés), entidades descubiertas en su inmensa mayoría a partir de las técnicas de secuenciación masiva, algunos de los cuales se agrupan dentro de los géneros flavivirus y alfavirus, son transmitidos exclusivamente en la población de insectos y por vía vertical⁽⁴⁵¹⁾. El esclarecimiento de los mecanismos a través de los cuales los arbovirus infectan la descendencia de una hembra, permitirá evaluar más certeramente las implicaciones epidemiológicas de este modo de transmisión.

Se afirma que VZIK exhibe índices de TV ligeramente superiores que los VDENS⁽⁴³³⁾. Sin embargo, las TTV y TIFM de los flavivirus ensayados alcanzaron valores similares en y entre las poblaciones PTE y PRG, lo que indica que, las diferencias en las tasas de infección mínima por los VDENS y VZIK encontradas en el terreno entre las áreas de estudio, deben ser consecuencia de una circulación diferencial de estos virus en las áreas más que de habilidades diferenciales de las poblaciones de mosquitos para transmitir verticalmente estos flavivirus. No obstante, el serotipo que marcó una diferencia significativa entre las áreas de salud Pasteur y Párraga durante 2018, en cuanto a la TV fue VDEN-2, por lo que investigaciones futuras deberán enfocarse en los parámetros de TV de cada serotipo de dengue. De hecho, en Párraga la TIM encontrada para VDEN-1 (0,9) fue similar a la de VZIK (0,8), lo que apoya los resultados obtenidos en los ensayos de CoV y TV. Además, el genotipo de VZIK utilizado en los ensayos de TV (genotipo africano) fue diferente al encontrado en el terreno (genotipo asiático), lo cual pudiera modificar las potencialidades de TV de ambas poblaciones.

Los modos de transmisión horizontal y vertical, aunque relacionados, no tienen por qué ser dependientes entre sí. En ambas rutas, la diseminación a través de la lámina basal del intestino resulta clave para infectar y colonizar los órganos blanco que garantizan cada modo de transmisión: las glándulas salivares (en el caso de la TH) y los órgano y tejidos reproductivos en general (en el caso de la TV)⁽³¹¹⁾. Sin embargo, una pregunta

que continúa vigente es si siempre que una hembra expele virus en la saliva, también lo transmite a su descendencia; o si estos eventos ocurren independientemente.

De cualquier forma, las evidencias de TV en el terreno son dependientes de los virus que están circulando en un territorio en un momento dado^(452, 453) y eventualmente, de la intensidad de esa circulación. Aunque las poblaciones humanas locales no fueron encuestadas en nuestro estudio, la base de datos epidemiológicos de la provincia La Habana, registró, durante 2018, casi dos veces más casos de dengue en Párraga que en Pasteur⁽³³⁴⁾, lo que podría justificar el incremento de mosquitos infectados por TH en Párraga y por consiguiente mayores probabilidades para su TV. Este contexto epidemiológico se pudo desarrollarse con independencia de las habilidades similares comprobadas de estas poblaciones para transmitir los VZIK y VDEN-1 (y quizás el resto de los serotipos). Debemos recordar que el fenómeno de transmisión de arbovirus por mosquitos es un proceso complejo en el que, además del virus y el vector, participa el hospedero vertebrado (en este caso el humano), todos bajo la influencia de factores abióticos como temperatura, humedad, etc^(233, 374). En cuanto al ser humano, la infección con un arbovirus no solo está condicionada por determinantes biológicos (estatus inmunológico, genes, microbiota, etc.)^(163, 165), sino también por hábitos, actitudes, prácticas, situación socio-económica, etc., que definen en gran medida los niveles de exposición a los virus (en este caso mosquitos infectados)⁽⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶⁾. Aun cuando las poblaciones de mosquitos (PTE y PRG) fueron similarmente abundantes, al igual que su habilidad para transmitir horizontal y verticalmente los virus; los conocimientos, actitudes, prácticas y nivel socio-económico de las personas que habitan estas áreas son diferentes, lo que pudiera definir su exposición a los patógenos y por tanto justificar la mayor cantidad de casos de dengue en Párraga que en Pasteur. Es por eso que resulta vital en el control y prevención de los agentes infecciosos, el trabajo comunitario, educativo y de comunicación con las poblaciones humanas⁽⁴⁵⁷⁻⁴⁶⁰⁾.

Por otro lado, los datos sobre TV de VCHIK en condiciones experimentales son escasos y presentan informes contradictorios^(29, 461, 462). De las tres publicaciones encontradas que ensayan TV en *Ae. aegypti*, en una de ellas los autores no detectan TV⁽⁴⁶¹⁾, mientras que en las otras dos se documentan grupos de la descendencia infectados con VCHIK en el 1^{er}CG⁽⁴⁶²⁾ y 3^{er}CG⁽²⁹⁾. Otros pocos estudios informan además TV de VCHIK en *Ae.*

albopictus^(463, 464). Sin embargo, en ninguno de ellos se estiman los parámetros de TV referidos anteriormente, sino tasas de infección mínima entre la descendencia de madres expuestas, lo que impide una comparación cuantitativa. Un meta-análisis concluyó que las TTV del género alfavirus en mosquitos son significativamente inferiores que la de los flavivirus⁽¹⁾, aunque nuestros resultados no dan fe de ese comportamiento, al menos no para los virus y especie de mosquito estudiados.

Dadas las diferencias en el examen de la progenie para la detección de la infección entre CGs, no resulta válida la comparación de los parámetros de TV entre ellos. Sin embargo, llama la atención que mientras las TTV de los flavivirus se incrementaron del 1^{er} al 2^{do} CG, la de VCHIK no lo hizo, alcanzando valores similares entre ambos ciclos (49% 1^{er}CG y 47% 2^{do}CG). Este resultado puede guardar relación con los menores tiempos que necesita VCHIK para lograr mayor diseminación en estas poblaciones (figura 3.7), proceso esencial para la TV. Los flavivirus, por el contrario, manifestaron una diseminación significativamente diferente entre los 7 y 14 dpe (figura 3.7), lo que pudiera explicar el comportamiento observado.

Los elevados índices de TV encontrados en algunos trabajos^(28, 317), de conjunto con las no despreciables TTV y TIFM expuestas en el presente capítulo, promueven que esta vía de transmisión sea mejor considerada tanto desde el punto de vista académico/investigativo como desde el control vectorial y la salud pública. La importancia de la TV de los VDENS, VCHIK y VZIK en *Ae. aegypti* ha sido subestimada y pudiera constituir una fuerza potencial que tribute a la epidemiología de la infección por arbovirus⁽³¹⁷⁾.

Como se esbozó anteriormente, la conexión entre las vías de TH y TV en mosquitos continúa siendo un asunto angular en el estudio de la dinámica de transmisión de arbovirus. En particular, la TV se cataloga, por algunos autores, como un modo de transmisión poco importante para la persistencia epidemiológica de los virus⁽³⁴⁾. Sin embargo, si comparamos las tasas de TV y TH obtenidas en nuestro estudio, observamos que la más baja TTV global en el 2^{do}CG sobrepasó el 40%, mientras que la mayor TTH (determinada como el por ciento de hembras infectadas con salivas positivas para cada virus) no sobrepasó el 20%. Aun cuando son conocidas las limitaciones de los ensayos de CoV en la determinación de las TT⁽⁴⁶⁵⁾, la frecuencia con que una hembra infectada

transmite los virus a su progenie, no parece ser comparativamente despreciable. Desde este enfoque, se debería reflexionar sobre las potencialidades de la TV para erigirse como una vía de transmisión que merece seguir siendo más y mejor estudiada.

4.4 Factibilidad del monitoreo de la transmisión vertical de arbovirus en poblaciones cubanas de *Aedes aegypti*

La comparación entre los virus detectados en las poblaciones inmaduras de *Ae. aegypti* y en humanos (informado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba)^(196, 466, 467) durante los periodos estudiados (2013-2014 y 2018-2019), coincidió en la presencia de los VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4 durante 2013-2014, así como VZIK, VDEN-2 y VDEN-3 durante 2018. Sin embargo, llama la atención que VDEN-1, de mayor prevalencia en el periodo 2013-2014 en larvas y pupas de Arroyo Naranjo, y presente también, aunque en menor proporción durante 2018 en Párraga; no se registró en ninguna de las muestras humanas examinadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK durante los intervalos 2013-2015, ni 2017-2018. Un conjunto de elementos pudiera explicar este fenómeno: i) En Cuba, la vigilancia virológica de los arbovirus se realiza en el Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK, adonde llegan las muestras provienen de pacientes sintomáticos que, por lo general, han desarrollado formas graves de la enfermedad (en el caso de dengue); ii) Globalmente, existe una preponderancia de los casos asintomáticos sobre los sintomáticos en la enfermedad por dengue⁽¹⁰⁾. La frecuencia relativa entre ellos varía de acuerdo con el contexto epidemiológico, el estatus inmunológico del paciente y los serotipos y genotipos circulantes⁽¹⁶⁵⁾. En Cuba, la investigación más reciente apunta a una relación asintomáticos/sintomáticos de 13/1⁽⁴⁶⁸⁾. iii) De manera general, VDEN-1 no se asocia con manifestaciones severas de la enfermedad en Las Américas⁽¹¹⁹⁾, aunque se plantea que puede jugar un papel importante en la sensibilización de la población humana para una segunda infección por dengue⁽⁴⁶⁹⁻⁴⁷¹⁾. iv) Por otro lado, se demostró que las personas con infecciones naturales por VDEN y sin síntomas clínicos contribuyen a la dinámica de transmisión a través de la eficiente infección de mosquitos *Ae. aegypti*⁽⁴⁷²⁾. Duong *et al.*, 2015⁽⁴⁷²⁾ observaron que personas con infecciones asintomáticas o pre-sintomáticas infectaron mosquitos con una viremia en sangre 100 veces más baja que lo que lo hicieron los casos sintomáticos.

Estos mosquitos infectados desarrollaron una carga viral mayor en comparación con aquellos *Ae. aegypti* alimentados sobre las personas con infecciones sintomáticas, lo que interpretaron como un mayor potencial de transmisión. v) También se debe tener en cuenta que las personas asintomáticas o pre-sintomáticas están expuestas a la picada de vectores de varios lugares que visiten ya que, por lo general, no interrumpen su rutina diaria, lo que los convierte además en una fuente importante en la dispersión de estos virus^(366, 472). Tampoco se debe descartar que las personas infectadas por dengue y que manifiestan síntomas leves, comúnmente no asisten a los centros asistenciales y portan la infección sin aislamiento que evite la transmisión. Esta realidad, además de potenciar la dispersión arboviral, impide que los sistemas de vigilancia puedan detectarlos y tipificarlos.

Lo descrito anteriormente sugiere que el VDEN-1 circulante entre 2013 y 2014 y probablemente también en 2018, provocó una gran cantidad de casos asintomáticos o con síntomas leves que favoreció posiblemente una gran dispersión del serotipo de mayor tasa de transmisión vertical⁽¹⁾ e impidió su detección por los sistemas de vigilancia establecidos en el país. De forma similar, Ferreira de Lima *et al.*, 2020⁽⁴⁷³⁾ describieron una posible circulación silente de VDEN-3 en San Paulo, Brasil, a partir de su detección en *Ae. albopictus* colectados como huevos, sin que hubiera registro de casos en la ciudad.

Por otro lado, durante nuestra experimentación encontramos TTV globales superiores al 44% para todos los virus en el 2^{do}CG; es decir que al menos 4 de cada 10 hembras infectadas transmitieron los virus a algún miembro de su descendencia; mientras que, como mínimo, un promedio del 5-10% de la descendencia “heredó” la infección. Tomando estos valores como referencia y con las evidencias obtenidas de los ensayos de terreno, podemos recomendar el monitoreo de la TV de arbovirus en *Ae. aegypti* como una herramienta que complemente la vigilancia de estos agentes en humanos, en el contexto cubano.

Los sistemas de vigilancia de arbovirus son de suma importancia, ya que monitorean la circulación viral y emergencia de nuevos entes⁽⁴⁹⁾. Las Organizaciones Mundial y Panamericana de la Salud, así como varios autores, ponderan la estimación de las tasas de infección en poblaciones de mosquitos para determinar los niveles de transmisión de

un patógeno dado en la población humana^(49, 474, 475). La vigilancia entomo-virológica o xeno-vigilancia son los términos empleados para acuñar los procedimientos de búsqueda de virus en mosquitos como indicador directo de infección en humanos⁽⁴⁹⁾. Además, dado el elevado número de asintomáticos y levemente sintomáticos que provoca la infección por estos arbovirus^(16, 159), la búsqueda de este patógeno en mosquitos, constituye una herramienta necesaria y oportuna. En este sentido se propone la operacionalización de la vigilancia entomo-virológica en puntos calientes (*hotspots* en inglés)^(48, 476) como parte de sistemas de alerta temprana^(477, 478) que avizoren la aparición de brotes de arbovirus. Mientras la mayoría de las experiencias se centran en la pesquisa de mosquitos adultos^(474, 479-481), algunos autores han recomendado la xeno-vigilancia molecular en estadios inmaduros por ser tan informativa como el monitoreo de adultos^(36, 49, 432, 453), además que, desde el punto de vista práctico, la colecta de larvas en el terreno resulta más fácil y segura que la del imago⁽³¹⁰⁾. Estas propuestas constituyen un complemento a la vigilancia clínica y no deben remplazarla antes de que la correlación entre las tasas de infección en poblaciones humanas y de mosquitos sean mejor entendidas⁽⁴⁹⁾. Con este fin, próximos estudios deberán monitorear la presencia de arbovirus en mosquitos adultos y larvas en una misma área con el fin de establecer posibles correlaciones y causalidades en la infección de ambos estadios. De cualquier manera, la introducción gradual y progresiva de la vigilancia entomo-virológica en los programas de vigilancia de arbovirus en Cuba es altamente recomendada, ya que podría proveer a los sistemas de vigilancia arbovirológica, de otra fuente de información para enriquecer la que se obtiene a partir de los sistemas de vigilancia implementados actualmente.

4.5 Estimación del aporte de la transmisión vertical a la transmisión horizontal

Aunque demostrada la TV de los VDENs, VCHIK y VZIK, su relevancia epidemiológica es controversial, ya que el mantenimiento de los virus en la población de mosquitos a través de la transferencia materna, por sí sola, no garantiza el contagio de vertebrados. La infección de un hospedero vertebrado requiere necesariamente la inoculación del virus presente en la saliva de hembras de mosquitos vectores^(30, 43, 44). No obstante, hasta

el momento no existe ninguna evidencia de la presencia de partículas virales infectivas de VDENV-1, VCHIK ni VZIK en la saliva de *Ae. aegypti* infectadas verticalmente. En este estudio se demuestra, por primera vez, la capacidad infectiva de hembras recién emergidas para transmitir VCHIK y VZIK, a través de la detección de virus infecciosos y con capacidad replicativa en su saliva. También encontramos diseminación de VDENV-1 en cabezas de la descendencia femenina. Las secuencias nucleotídicas de VCHIK obtenidas de muestras de saliva y VDENV-1 de cabeza de hijas confirman nuestro diagnóstico y hacen más robustos nuestros hallazgos.

Pocos estudios que involucran diversas combinaciones de especies de mosquitos-virus demostraron que hembras infectadas verticalmente pueden transmitir horizontalmente los virus. Por ejemplo, hijas descendientes de *Aedes (Protomacleaya) triseriatus* expuestas a VLAC (Orthobunyavirus, *Bunyaviridae*)⁽⁴⁸²⁻⁴⁸⁵⁾, de *Aedes (Ochlerotatus) dorsalis* expuestas al virus de la encefalitis de California (VEC) (Orthobunyavirus, *Bunyaviridae*)⁽⁴⁸⁶⁾ y de *Ae. albopictus* a VZIK⁽⁴⁸⁷⁾ infectaron ratones recién nacidos a través de su picada. Asimismo, otro estudio mostró que una cepa isofemenina de *Ae. aegypti*, altamente susceptible a VDENV-2, produjo descendencia infectada que secretó saliva positiva al virus⁽³⁶³⁾. Además, estudios recientes detectaron mediante RT-qPCR genomas de VZIK en glándulas salivares⁽⁴⁴²⁾ y salivas^(43, 46) de hembras de *Ae. aegypti* verticalmente infectadas en el laboratorio. Sin embargo, la detección de genomas virales por sí solos no prueba la presencia de partículas virales infecciosas⁽⁴³⁾. También se debe considerar que la mayoría de estos reportes demuestran el potencial infectivo de estas hembras usando colonias de mosquitos o cepas seleccionadas, altamente susceptibles a los virus^(43, 46, 363). Varios estudios demuestran que mosquitos colonizados o seleccionados en el laboratorio son más permisivos a la infección y diseminación viral que los mosquitos de terreno^(488, 489), lo cual probablemente también se podría traducir en una mayor propensión para la TV y conducir a estimaciones poco fidedignas. En nuestro caso, la primera generación de *Ae. aegypti* no colonizados mostró su capacidad para transmitir verticalmente los VDENV-1, VCHIK y VZIK a su descendencia que pudo, a su vez, ser infectiva (en el caso de los VZIK y VCHIK), proporcionando, por tanto, una imagen más realista de la dinámica de transmisión de arbovirus.

En relación a VZIK, la TIF-S obtenida (12%) concuerda con resultados anteriores que informan la detección de ARN viral en 2-17% de las glándulas salivares⁽⁴⁴²⁾ y entre 2-17% de la saliva de hembras de *Ae. aegypti* verticalmente infectadas^(43, 46). Sin embargo, otro estudio conducido por Nuñez *et al.*, 2020⁽⁴⁵⁾ no encontró VZIK en la saliva de hembras de *Ae. albopictus* infectadas verticalmente en el laboratorio. A pesar de las diferencias metodológicas entre estos estudios, en su conjunto sugieren que una proporción de hijas de mosquitos infectados con VZIK pueden mantener la circulación de este virus no solo entre la población del vector, sino también desencadenar la transmisión a humanos.

Se estima que el PIE de VZIK en *Ae. aegypti* varía entre los 7 y 10 días^(289, 398, 427, 490), aunque puede alcanzar los 14 días para ciertos genotipos del flavivirus⁽²⁸⁹⁾. Teniendo en cuenta que hembras adultas son potencialmente capaces de transmitir el virus justo después de su emergencia, una significativa reducción del PIE se estimaría en el 12% de las hijas provenientes de madres que transmitieron el virus verticalmente (tabla 3.4). Según la TIVe-S, el 2% de la descendencia femenina de cada hembra infectada con VZIK podría “heredar” su estatus infectivo (tabla 3.4). Resulta interesante cómo diferentes estudios de CoV en diversas partes del mundo destacaron el relativamente bajo potencial de transmisión de *Ae. aegypti*, lo cual contrastaba con la rápida dispersión de VZIK a lo largo de varias regiones^(398, 427, 490). A la luz de los resultados presentados aquí, además de la gran cantidad de población humana susceptible a VZIK y la elevada abundancia y antropofilia del vector⁽³⁹⁸⁾, el potencial infectivo de hembras infectadas verticalmente también pudo balancear la baja capacidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* para transmitir horizontalmente este virus.

Esta es la primera vez que se demuestra que hembras descendientes de madres infectadas con VCHIK pueden excretar partículas virales en su saliva. Para lograr una contribución tangible de la TV a la TH no solo basta con la infectividad de la descendencia, también se debe tener en cuenta la frecuencia y proporción con que las madres infectadas “producen” hijas infectivas. En el presente estudio encontramos que i) la mitad de las madres infectadas con VCHIK produjo al menos una hija infectiva (TTV-S=50%), ii) el 19% de las hijas provenientes de madres que transmitieron verticalmente el virus, tuvieron salivas positivas (TIF-S=19%), y iii) una de cada 10 hembras

descendientes de una madre positiva a VCHIK, pudieron, teóricamente transmitir el virus en la saliva (TIVe-S=10%) (tabla 3.4). Aun cuando tamaños de muestra superiores u otras combinaciones de población de mosquito-cepa viral, pudieran arrojar estimaciones diferentes, nuestros resultados destacan el potencial epidemiológico de la TV de VCHIK en *Ae. aegypti*. Como se afirmó anteriormente para VZIK, la TV de VCHIK probablemente asegure la circulación del virus en la naturaleza y contribuya a su TH. A diferencia de los ensayos de infección con VDEN-1, no se examinaron las cabezas de las hijas con salivas negativas a VZIK/VCHIK, lo que nos impide especular sobre potenciales barreras en la descendencia a la infección por vía materna.

Como se expuso previamente, no se detectó VDEN-1 en la saliva de ninguna de las hijas de madres infectadas, aunque sí en la cabeza de seis de ellas. No obstante, no se puede descartar el potencial de la TV para desencadenar TH también para este virus, ya que es conocido que los métodos de colecta *in vitro* de saliva subestiman el número de salivas positivas y la cantidad de virus en ellas⁽⁴⁶⁵⁾. Además, la presencia de VDEN-1 en cabezas del 16% de la descendencia femenina después de la amplificación en cultivos celulares, indicó la existencia de virus funcionales. Aunque el tropismo viral en mosquitos infectados verticalmente todavía se desconoce, la diseminación a la cabeza se considera usualmente como un proxy del potencial transmisor de un vector^(200, 491-493). La no/baja detección de VDEN-1 en la progenie pudo deberse a bajas cargas virales o capacidades limitadas (en cuanto a sensibilidad) de detección viral. En nuestros experimentos observamos, incluso después de la amplificación en células, 15 muestras de salivas con Ct>34 para VCHIK, similar a lo descrito previamente en ensayos semejantes con VZIK⁽⁴³⁾. Durante el 2^{do}CG, se encontraron familias con hijas positivas y grupos de machos negativos y viceversa, así como una gran heterogeneidad en la infección de la progenie en general (figura 3.9). Bosio *et al.*, 1992⁽⁴³⁶⁾ observaron una extensa variación en las TIF en familias de *Ae. albopictus* infectadas con VDEN-1 y concluyeron que las poblaciones, así como los individuos que las componen, pueden variar ampliamente en su habilidad para transmitir verticalmente el virus.

La comprobación de la infección en machos adultos abre la interrogante sobre la potencialidad de la transmisión venérea en la infección de hembras. Algunos estudios verificaron la capacidad de machos infectados intra-torácica^(315, 318, 319) y

verticalmente⁽³¹⁷⁾ para transmitir por vía sexual los VDENS, VCHIK y VZIK a hembras vírgenes, lo cual confiere a este género mayor importancia que la que hasta hoy se había dado en la dinámica de transmisión de arbovirus en poblaciones de *Ae. aegypti*. La conducta altamente polígama de los machos de *Ae. aegypti* se sugiere como un posible factor de apoyo para la transmisión sexual de arbovirus, que se presenta como otra vía potencial para el mantenimiento de estos en la naturaleza⁽²⁹³⁾. Aunque futuros estudios deberán investigar sobre el potencial de diseminación y transmisión vertical y horizontal ulteriores en hembras infectadas sexualmente⁽³¹⁷⁾, una modelización matemática concluyó que ambas vías de transmisión (vertical y venérea) activas pueden asegurar la sostenibilidad de los virus en las poblaciones de mosquitos⁽⁴⁹⁴⁾.

Si bien estas vías “alternativas” de transmisión se presentan como modos de mantenimiento de los virus en la naturaleza durante condiciones adversas para la TH (*i.e.* escasez de vertebrados susceptibles, inviernos/sequías, entre otros)^(1, 34); sus implicaciones en el mantenimiento de epidemias mediante la generación de nuevos ciclos de TH son elementos a considerar. El hallazgo de hembras con potencial infeccioso vía TV (y no mediante TH) inmediatamente después de su emergencia demuestra la capacidad de esta ruta para producir hembras infectivas que no necesitan del encuentro con un hospedero en fase virémica, ni de un PIE para adquirir el estatus infeccioso, lo cual incrementaría el “período infectivo” del vector, y por tanto aceleraría la dinámica de transmisión de arbovirus. De esta forma, el tiempo necesario para que se produzca un nuevo caso humano se reduciría significativamente para los flavivirus que requieren normalmente entre 7-10 días para que una hembra se “transforme” en infectiva después de adquirir el virus de un humano^(490, 495). De la misma forma encontramos que a partir de una madre infectada varias hijas pueden “heredar” el estatus infeccioso, con lo que, además, se multiplicaría el número de hembras infectivas en una población dada.

Estos resultados poseen un valor epidemiológico importante, si tenemos en cuenta que pudieran modificar los modelos de pronósticos de epidemias de arbovirus a partir de la modificación del R_0 , parámetro teórico que proporciona información acerca de la velocidad con que una enfermedad puede propagarse en una población determinada⁽⁴⁹⁶⁾. La modelación matemática de epidemias y el consecuente pronóstico

del número de nuevos casos en el tiempo, resultan valiosísimos para la preparación de los sistemas de salud en la atención a pacientes y respuesta a brotes⁽⁴⁹⁷⁾.

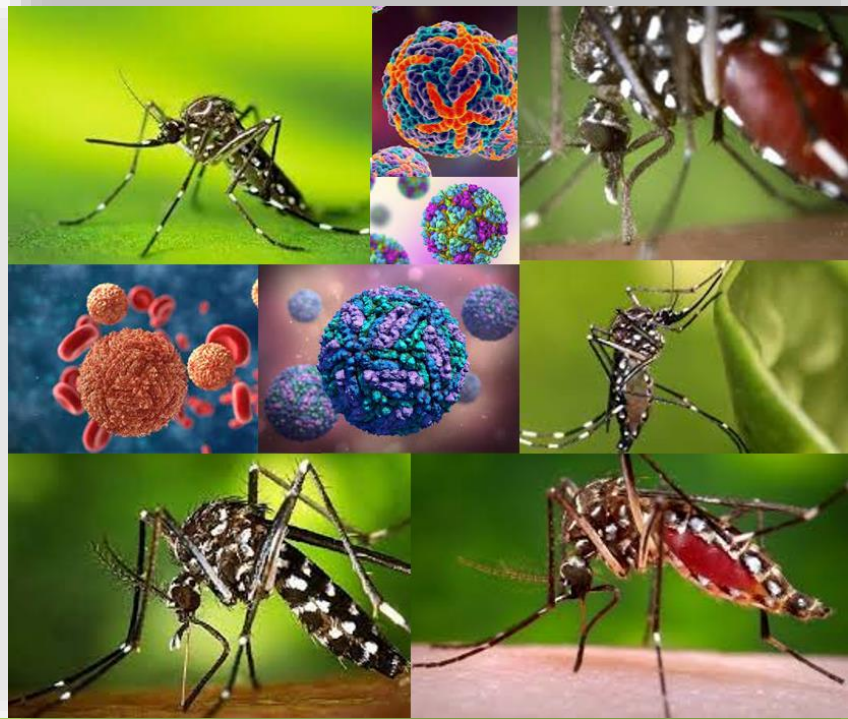
Desde el punto de vista académico, estos resultados son igualmente trascendentales. Es ampliamente aceptado en la literatura científica especializada que la forma en que un mosquito adquiere la infección por un arbovirus es mediante la ingestión de sangre de un hospedero en fase virémica. Esta es prácticamente la única fuente descrita de adquisición de partículas virales por el mosquito, las cuales se replican en su epitelio intestinal y diseminan al hemocele para llegar a las glándulas salivares y ser excretadas posteriormente en la saliva durante una próxima picada, infectando así a un nuevo vertebrado⁽⁴⁹⁸⁻⁵⁰⁰⁾. La TH, es considerada la principal ruta de transmisión de los arbovirus⁽⁴⁹⁸⁾, y desde el punto de vista del humano, es totalmente cierto (las personas se infectan a través de la picada de mosquitos infectados). Sin embargo, a la luz de los conocimientos aportados por la presente investigación, se debe reflexionar si, desde el punto de vista del mosquito, la adquisición de los virus a partir de la alimentación sobre un humano en fase virémica puede seguir siendo la vía de infección más importante, o si la TV constituye un modo comparablemente significativo de adquisición de la infección. De cualquier forma, para ser rigurosos, se debería reconocer un cambio en ese paradigma de infección y aceptar que, además, los mosquitos (al menos *Ae. aegypti*) pueden ser infectados y transformarse en infectivos a partir de su progenitora. Por supuesto, el campo de la TV de arbovirus en mosquitos necesita y amerita estudios profundos de los factores fisiológicos, genéticos, anatómicos, inmunológicos, etc. que determinan su ocurrencia.

La TV ha sido enormemente olvidada y subestimada por décadas, probablemente debido a la escasez de informes, asociada a las dificultades técnicas (*i.e.* la detección de bajas cargas virales) para su demostración en el terreno o el laboratorio⁽³⁰⁾. En este sentido, capacidades de detección viral más sensibles permitirían estimaciones de TV más precisas. Otro elemento a considerar es la carga viral en saliva que alcanzan estas hembras infectadas verticalmente. En nuestro estudio, solo pudimos estimar las cargas virales directamente en menos del 50% de las hembras con salivas positivas a VCHIK por TV, lo que nos impide elaborar conclusiones más globales en relación a los títulos virales que alcanzan los arbovirus en la saliva de mosquitos infectadas verticalmente.

No obstante, en el modelo *Ae. aegypti*-VCHIK, estos valores fueron comparables con títulos previamente obtenidos en hembras infectadas por vía oral (ver tabla 3.3). Esto podría sugerir que la carga viral en saliva a partir de la TV podría ser suficiente para infectar un humano. Sin embargo, los títulos virales umbrales en salivas que garantizan la infección eficiente del hospedero vertebrado dependen de varios factores como el estatus inmunológico de este último, y no están todavía del todo determinados⁽⁵⁰¹⁻⁵⁰⁴⁾. Es por eso que estudios futuros debieran comprobar la infectividad de hembras contagiadas verticalmente usando modelos animales.

Por último, nuestros hallazgos resaltan la necesidad imperiosa de considerar la TV en los programas de control vectorial y adaptarlos en consecuencia. Dados los fuertes rasgos antropofílicos y domésticos de *Ae. aegypti* y las enormes consecuencias que acarrearán las infecciones por arbovirus para la salud pública en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, las campañas de comunicación social deberían ser revisadas, y los esfuerzos de control deberían tener en cuenta también los períodos inter-epidémicos o de baja densidad de mosquitos, ya que algunos sitios de cría podrían ser fuente de hembras ya infectivas.

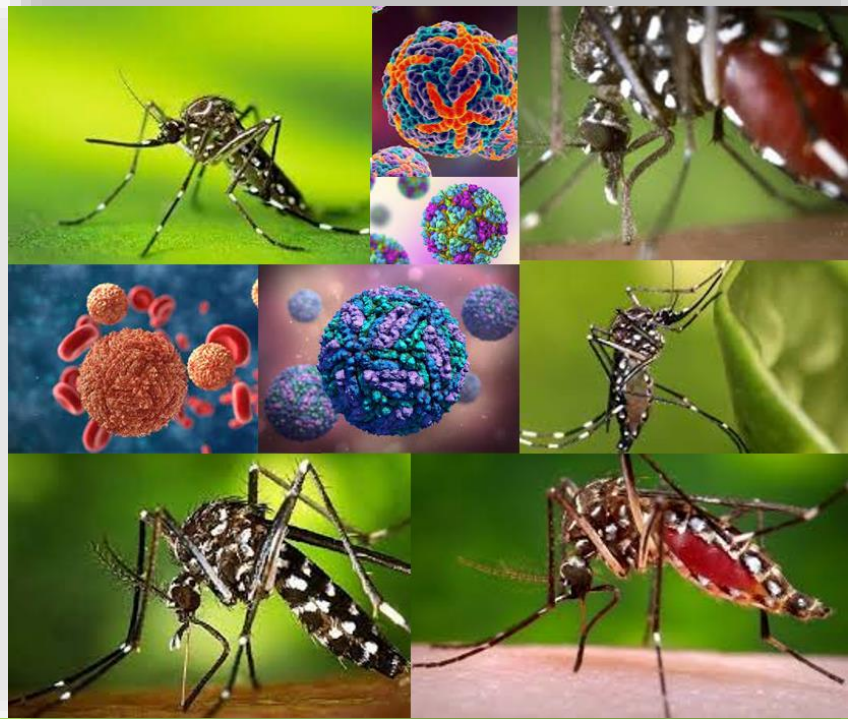
En resumen, los resultados obtenidos en la presente investigación (i) verificaron la ocurrencia de TV de los VDENS y VZIK en poblaciones cubanas de *Ae. aegypti* en condiciones naturales, (ii) determinaron un patrón de distribución espacio-temporal en los territorios evaluados y (iii) constituyen la primera estimación de los parámetros de competencia vectorial y transmisión vertical de poblaciones locales de *Ae. aegypti* a los tres arbovirus más importantes en la región, alertando sobre las potencialidades reales de introducción y dispersión de VCHIK en Cuba. Por último, demostramos la trascendencia epidemiológica de la TV de arbovirus en *Ae. aegypti*, al comprobar que hembras infectadas verticalmente son potencialmente capaces de transmitir los virus horizontalmente en su saliva, y de la misma forma, a partir de una madre infectada varias hijas pueden “heredar” el estatus infeccioso. Estos elementos en su conjunto, respaldan la inclusión del monitoreo de la TV en *Ae. aegypti* como una herramienta útil para la vigilancia de arbovirus en Cuba.



Conclusiones

CONCLUSIONES

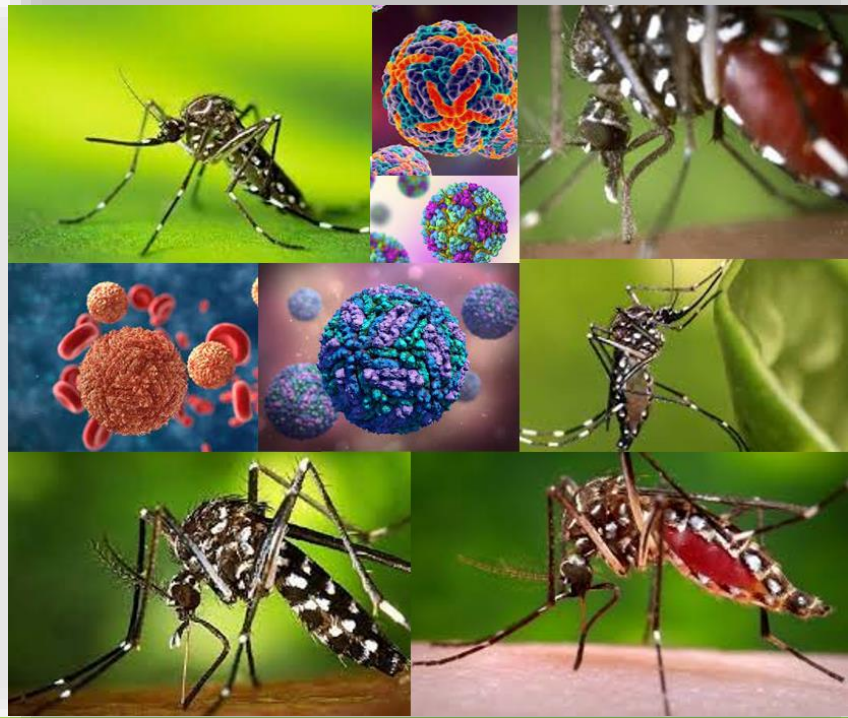
- La detección de la circulación simultánea de los cuatro serotipos de dengue y del virus Zika en estadios inmaduros de *Ae. aegypti* en varias áreas de La Habana constituye la primera evidencia de la transmisión vertical de estos virus en Cuba. Las frecuencias y tasas de infección por los virus del dengue sugieren su circulación sostenida en las poblaciones del vector de los sitios estudiados y avalan la utilidad del monitoreo de la transmisión vertical de arbovirus en *Aedes aegypti* como una herramienta para la vigilancia virológica.
- La competencia vectorial moderada (tasas de transmisión <25%) y similar observada para los VDEN-1 y VZIK entre las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas, confirman la implicación de este vector en la transmisión de estos flavivirus durante los brotes/epidemias que han tenido lugar en La Habana. La habilidad de esta especie para transmitir el VCHIK desde los tres días post exposición, alerta sobre el riesgo latente de brotes y epidemias de este alfavirus en Cuba.
- La comprobación experimental de la transmisión vertical de los VDEN-1, VCHIK y VZIK en las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas, durante el primer y segundo ciclos gonadotróficos, tanto a machos como hembras de la descendencia; confirman los resultados encontrados en condiciones naturales y refuerzan la importancia del control de las poblaciones pre-adultas del vector en la prevención de la circulación de arbovirus.
- La detección de partículas virales infecciosas de VCHIK y VZIK en la saliva de hembras de *Ae. aegypti* infectadas verticalmente, demuestra la capacidad de esta vía de transmisión para generar vectores con potencialidad para infectar horizontalmente hospederos vertebrados. Asimismo, la presencia de VDEN-1 en cabezas de hembras infectadas verticalmente alerta sobre la posible ocurrencia de este mecanismo también en el par *Ae. aegypti*-VDEN-1.



Recomendaciones

RECOMENDACIONES

- Evaluar los parámetros de competencia vectorial y transmisión vertical de poblaciones cubanas de *Ae. aegypti* a los cuatro serotipos de dengue.
- Profundizar en los mecanismos y factores que influyen la transmisión vertical de arbovirus en *Ae. aegypti*.
- Comprobar la capacidad infecciosa de hembras de *Ae. aegypti* infectadas verticalmente empleando modelos animales.
- Verificar la capacidad de hembras colectadas en campo e infectadas verticalmente para expeler virus en la saliva.



Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. PLoS Pathog [Internet]. 2016;12(5):e1005548. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>
2. Swei A, Couper LI, Coffey LL, Kapan D, Bennett S. Patterns, drivers, and challenges of vector-borne disease emergence. Vector Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2020;20(3):159-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31800374>.
3. Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. West J Emerg Med [Internet]. 2016;17(6):671-9. Available from: <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>
4. Paixão ES, Teixeira MG, Rodrigues LC. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. BMJ Glob Health [Internet]. 2018;3(1):e000530. Available from: <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000530>
5. Powell JR. Mosquito-borne human viral diseases: Why *Aedes aegypti*? Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2018;98(6):1563-5. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0866>
6. Organización Mundial de la Salud. Partes sobre brotes epidémicos; dengue: situación mundial [Internet]. 2023 [updated 21 de diciembre de 2023] Available from: <https://www.who.int/es/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>
7. Heath CJ, Grossi-Soyster EN, Ndenga BA, Mutuku FM, Sahoo MK, Ngugi HN, et al. Evidence of transovarial transmission of chikungunya and dengue viruses in field-caught mosquitoes in Kenya. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2020;14(6):1-17. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008362>
8. Khan J, Khan I, Ali I, Iqbal A, M. S. The role of vertical transmission of dengue virus among field-captured *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in Peshawar, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. Pakistan J Zool [Internet]. 2017;49(3):777-84. Available from: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.3.777.784>
9. Ferreira-de-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. Parasit Vectors

- [Internet]. 2018;11(1):77. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2643-9>
10. Chastel C. Eventual role of asymptomatic cases of dengue for the introduction and spread of dengue viruses in non-endemic regions. *Front Physiol* [Internet]. 2012;3:70. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00070>
 11. Organización Panamericana de la Salud. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication [Internet] no.548. Washington: PAHO;1994. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/40300>
 12. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* [Internet]. 1999;257(1):1-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208914>
 13. de Souza WM, Ribeiro GS, de Lima STS, de Jesus R, Moreira FRR, Whittaker C, et al. Chikungunya: a decade of burden in the Americas. *Lancet Reg Health Am* [Internet]. 2024;30:100673. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2023.100673>
 14. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;372(13):1231-9. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1406035>
 15. Ferguson NM, Cucunubá ZM, Dorigatti I, Nedjati-Gilani GL, Donnelly CA, Basáñez MG, et al. EPIDEMIOLOGY. Countering the Zika epidemic in Latin America. *Science* [Internet]. 2016;353(6297):353-4. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aag0219>
 16. Ladhani SN, O'Connor C, Kirkbride H, Brooks T, Morgan D. Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain-Barré syndrome. *Arch. Dis. Childh* [Internet]. 2016;101(7):600-2. Available from: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310590>
 17. Gutiérrez-Bugallo G, Piedra LA, Rodriguez M, Bisset JA, Lourenço-de-Oliveira R, Weaver SC, et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. *Nat Ecol & Evol* [Internet]. 2019;3(4):561-9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>

18. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas [Internet]. OPS, Washington, D.C. EUA. 2.ed. 2016. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/28232>
19. Organización Mundial de la Salud. Declaración de la OMS sobre la primera reunión del Comité de Emergencia del Reglamento Sanitario Internacional (2005) sobre el virus del Zika y el aumento de los trastornos neurológicos y las malformaciones congénitas [Internet] 2016 [updated 1 de febrero de 2016] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>
20. Mas Lago P. Dengue fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication [Internet]. 1979;375:40-3.
21. Guzmán MG, Vázquez S, Álvarez M, Pelegrino JL, Ruiz D, Martínez PA, et al. Vigilancia de laboratorio de dengue y otros arbovirus en Cuba, 1970-2017. Revista Cuba Med Trop [Internet]. 2019;71(1). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602019000100008&lng=es&nrm=iso
22. Organización Panamericana de la Salud. PLISA– Health Information Platform for the Americas. Chikungunya [Internet] 2020. Available from: <https://www.paho.org/data/index.php/en/>.
23. Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and Yellow Fever mosquito. Evol [Internet]. 2014;68(2):514-25. Available from: <https://doi.org/10.1111/evo.12281>
24. Clemons A, Haugen M, Flannery E, Tomchaney M, Kast K, Jacowski C, et al. *Aedes aegypti*: An emerging model for vector mosquito development. Cold Spring Harb. Protoc. [Internet]. 2010;2010(10):pdb emo141. Available from: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/10/pdb.emo141.full.pdf>.
25. Ritchie SA. Dengue vector bionomics: why *Aedes aegypti* is such a good vector? 2014. In: Dengue and dengue hemorrhagic fever [Internet]. CAB International. 2nd Edition. Available from: 455-80.

<https://www.cabi.org/Uploads/CABI/OpenResources/39649/Gubler%20Chapter%2024.pdf>

26. Hardy JL, Houk E, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann Rev Entomol* [Internet]. 1983;28:229-62. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001305>
27. Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2002;67(2):158-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12389940>
28. Manuel M, Missé D, Pompon J. Highly efficient vertical transmission for Zika virus in *Aedes aegypti* after long extrinsic incubation time. *Pathogens* [Internet]. 2020;9(5). Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050366>
29. Agarwal A, Dash PK, Singh AK, Sharma S, Gopalan N, Rao PV, et al. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014;8(7):e2990. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002990>
30. Lequime S., L. L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;28:681-90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.025>
31. Jain J, Kushwah RBS, Singh SS, Sharma A, Adak T, Singh OP, et al. Evidence for natural vertical transmission of chikungunya viruses in field populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana states in India-a preliminary report. *Acta Trop* [Internet]. 2016;162:46-55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.004>
32. Izquierdo-Suzán M, Zárate S, Torres-Flores J, Correa-Morales F, González-Acosta C, Sevilla-Reyes EE, et al. Natural vertical transmission of Zika virus in larval *Aedes aegypti* populations, Morelos, Mexico. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2019;25(8):1477-84. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2508.181533>
33. Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1983;32(3):590-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6859404>.

34. Grunnill M, Boots M. How important is vertical transmission of dengue viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae)? J Med Entomol [Internet]. 2016;53(1):1-19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2010.01.001>
35. Chaves BA, Junior ABV, Silveira KRD, Paz ADC, Vaz E, Araujo RGP, et al. Vertical transmission of Zika virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Amazonian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) delays egg hatching and larval development of progeny. J Med Entomol [Internet]. 2019;56(6):1739-44. Available from: <https://doi.org/10.1093/jme/tjz110>
36. Maniero VC, Rangel PSC, Coelho LMC, Silva CSB, Aguiar RS, Lamas CC, et al. Identification of Zika virus in immature phases of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A surveillance strategy for outbreak anticipation. Braz J Med Biol Res [Internet]. 2019;52(11):e8339. Available from: <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198339>
37. Maia LMS, Bezerra MCF, Costa MCS, Souza EM, Oliveira MEB, Ribeiro ALM, et al. Natural vertical infection by dengue virus serotype 4, Zika virus and Mayaro virus in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus*. Med Vet Entomol [Internet]. 2019;33(3):437-42. Available from: <https://doi.org/10.1111/mve.12369>
38. da Costa CF, da Silva AV, do Nascimento VA, de Souza VC, Monteiro D, Terrazas WCM, et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2018;12(7):e0006594. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006594>
39. Angel B, Angel A, Joshi V. Multiple dengue virus types harboured by individual mosquitoes. Acta Trop [Internet]. 2015;150:107-10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.007>
40. Edillo FE, Sarcos JR, Sayson SL. Natural vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* in selected sites in Cebu City, Philippines. J Vector Ecol [Internet]. 2015;40(2):282-91. Available from: <https://doi.org/10.1111/jvec.12166>
41. Granger Neto HP, Rocha CVS, Correia TML, Silva N, Chaves BA, Secundino NFC, et al. Natural vertical cotransmission of dengue virus and chikungunya virus from *Aedes aegypti* in Brumado, Bahia, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2022;55:e0427. Available from: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0427-2021>

42. Esteva L, C. V. Influence of vertical and mechanical transmission on the dynamics of dengue disease. *Math Biosci* [Internet]. 2000;167(1):51-64. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0025-5564\(00\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0025-5564(00)00024-9)
43. Comeau G, Zinna RA, Scott T, Ernst K, Walker K, Carrière Y, et al. Vertical transmission of Zika virus in *Aedes aegypti* produces potentially infectious progeny. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2020;103(2):876-83. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0698>
44. Adams B, Boots M. How important is vertical transmission in mosquitoes for the persistence of dengue? Insights from a mathematical model. *Epidemics* [Internet]. 2010;2(1):1-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21352772>.
45. Nuñez AI, Talavera S, Birnberg L, Rivas R, Pujol N, Verdún M, et al. Evidence of Zika virus horizontal and vertical transmission in *Aedes albopictus* from Spain but not infectious virus in saliva of the progeny. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2020;9(1):2236-44. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1830718>
46. Zimler RA, Alto BW. Vertical transmission of Zika virus by Florida *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Insects* [Internet]. 2023;14(3):289. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4450/14/3/289>.
47. Li CX, Guo XX, Deng YQ, Xing D, Sun AJ, Liu QM, et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017;6(4):e23. Available from: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.8>
48. Leandro AS, Lopes RD, Amaral Martins C, Delai RM, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R. Entomo-virological surveillance followed by serological active survey of symptomatic individuals is helpful to identify hotspots of early arbovirus transmission. *Front Public Health* [Internet]. 2022;10:1024187. Available from: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1024187>
49. Cameron MM, Ramesh A. The use of molecular xenomonitoring for surveillance of mosquito-borne diseases. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 2021;376(1818):20190816. Available from: <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0816>
50. Bisset Lazcano JA, Marquetti Fernández MdC, Montada Dorta D, Hernández Contreras N, Leyva Silva M, Fuentes González O, et al. Aportes científicos del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" a la vigilancia de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en

- Cuba, 1982-2020. Rev Cuba Med Trop [Internet]. 2021;73. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602021000300015&nrm=iso.
51. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. Infect Genet Evol [Internet]. 2019;67:191-209. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
 52. Gutiérrez-Bugallo G, Rodríguez-Roche R, Díaz G, Vázquez A. A, Alvarez M, Rodríguez M, et al. First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. Acta Trop [Internet]. 2017;174:146-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.012>.
 53. Centers for Disease Control and Prevention. Arbovirus Catalog [Internet] 2010 [consultado 07/05/2023]. Atlanta, GA, USA. Available from: <http://wwwn.cdc.gov/Arbocat/Default.aspx>.
 54. Ciota AT, Kramer LD. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. Viruses [Internet]. 2010;2(12):2594-617. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185588/pdf/viruses-02-02594.pdf>.
 55. Shragai T, Tesla B, Murdock C, Harrington LC. Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2017;1399(1):61-77. Available from: <https://doi.org/10.1111/nyas.13306>
 56. Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. Med Clin N [Internet]. 2008;92(6):1377-90, x. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061757>
 57. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. Antiviral Res [Internet]. 2010;85(2):328-45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.
 58. Strauss JH, Strauss EG. Viruses and human disease. San Diego: Academic Press; 2002. 371 p.
 59. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell [Internet]. 2002;108(5):717-25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893341>.

60. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann Rev Microbiol* [Internet]. 1990;44:649-88. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>
61. Gebhard LG, Filomatori CV, Gamarnik AV. Functional RNA elements in the dengue virus genome. *Viruses* [Internet]. 2011;3(9):1739-56. Available from: <https://doi.org/10.3390/v3091739>.
62. Weaver SC, N. V. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2009;;9:523-40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>
63. Yeh SC, Pompon J. Flaviviruses produce a subgenomic flaviviral RNA that enhances mosquito transmission. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2018;37(3):154-9. Available from: <https://doi.org/10.1089/dna.2017.405>
64. Pompon J, Manuel M, Ng GK, Wong B, Shan C, Manokaran G, et al. Dengue subgenomic flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017;13(7):e1006535. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006535>
65. Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Fields BM, editor. *Virology*. 1. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1996. p. 931-60.
66. Gopala Reddy SB, Chin WX, Shivananju NS. Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2018;154:54-63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.04.008>
67. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. In: Knipe DM, Howley OM, editors. *Fields Virology*. 5th Edition ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2011. p. 1101-51.
68. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017;6(3):e13. Available from: <https://doi.org/10.1038/emi.2016.141>
69. Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. *Fields Virology*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 712-46.

70. Richard AS, Shim BS, Kwon YC, Zhang R, Otsuka Y, Schmitt K, et al. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2017;114(8):2024-9. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1620558114>
71. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* [Internet]. 2015;347(6220):1260419. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
72. Vratskikh O, Stiasny K, Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Karrer U, et al. Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS Pathog* [Internet]. 2013;9(6):e1003458. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003458>
73. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* [Internet]. 2017;98(1):2-3. Available from: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
74. Metz SW, Gardner J, Geertsema C, Le TT, Goh L, Vlak JM, et al. Effective chikungunya virus-like particle vaccine produced in insect cells. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(3):e2124. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002124>
75. Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2018;25(1):13-20. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>
76. Diamond MS, Pierson TC. Molecular insight into dengue virus pathogenesis and its implications for disease control. *Cell* [Internet]. 2015;162(3):488-92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.005>
77. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* [Internet]. 2011;3(2):160-71. Available from: <https://doi.org/10.3390/v3020160>
78. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2008;11(4):369-77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>

79. Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* [Internet]. 1998;245(2):203-15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636360>.
80. Rosales Ramirez R, Ludert JE. The dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) is secreted from mosquito cells in association with the intracellular cholesterol transporter chaperone caveolin complex. *J Virol* [Internet]. 2019;93(4). Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.01985-18>
81. Back AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol* [Internet]. 2013;3. Available from: <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>
82. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, et al. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* [Internet]. 2008;319(5871):1834-7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1153264#tab-citations>.
83. Zaid A, Burt FJ, Liu X, Poo YS, Zandi K, Suhrbier A, et al. Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2021;21(5):e123-e33. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30491-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30491-6)
84. Khan AH, Morita K, Parquet Md Mdel C, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol* [Internet]. 2002;83(Pt 12):3075-84. Available from: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075>
85. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* [Internet]. 2009;393(2):183-97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>
86. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* [Internet]. 2010;468(7324):709-12. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature09555>

87. Dash PK, Santhosh SR, Shukla J, Dhanwani R, Rao PVL, Parida MM. Chikungunya Virus. In: Liu DY, editor. *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis CRC Press; 2010.
88. van Duijl-Richter M, Blijleven J, van Oijen A, Smit J. Chikungunya virus fusion properties elucidated by single-particle and bulk approaches. *J Gen Virol* [Internet]. 2015. Available from: <https://doi.org/10.1099/vir.0.000144>
89. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol* [Internet]. 2015;96(9):2483-500. Available from: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000249>
90. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* [Internet]. 1994;58(3):491-562. Available from: <https://doi.org/10.1128/mr.58.3.491-562.1994>
91. Ahola T, Merits A. Functions of chikungunya virus nonstructural proteins. In: CM O, editor. *Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment*. Cham, Switz.:Springer; 2016. p. 75–98.
92. Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Gen Virol* [Internet]. 2010;84(22):11679-95. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.01441-10>
93. Wong KZ, Chu JJH. The interplay of viral and host factors in chikungunya virus infection: Targets for antiviral strategies. *Viruses* [Internet]. 2018;10(6). Available from: <https://doi.org/10.3390/v10060294>
94. Spuul P, Salonen A, Merits A, Jokitalo E, Kääriäinen L, Ahola T. Role of the amphipathic peptide of Semliki forest virus replicase protein nsP1 in membrane association and virus replication. *J Virol* [Internet]. 2007;81(2):872-83. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.01785-06>
95. McPherson RL, Abraham R, Sreekumar E, Ong SE, Cheng SJ, Baxter VK, et al. ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2017;114(7):1666-71. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.162148511>
96. Kim KH, Rümenapf T, Strauss EG, Strauss JH. Regulation of Semliki Forest virus RNA replication: a model for the control of alphavirus pathogenesis in invertebrate

- hosts. Virology [Internet]. 2004;323(1):153-63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.009>
97. Thaa B, Biasiotto R, Eng K, Neuvonen M, Götte B, Rheinemann L, et al. Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. J Virol [Internet]. 2015;89(22):11420-37. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.01579-15>
98. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. Adv Virol [Internet]. 2011;2011:249640. Available from: <https://doi.org/10.1155/2011/249640>
99. Owen KE, Kuhn RJ. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. J Virol [Internet]. 1996;70(5):2757-63. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.70.5.2757-2763.1996>
100. Snyder JE, Kulcsar KA, Schultz KL, Riley CP, Neary JT, Marr S, et al. Functional characterization of the alphavirus TF protein. J Virol [Internet]. 2013;87(15):8511-23. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.00449-13>
101. Soonsawad P, Xing L, Milla E, Espinoza JM, Kawano M, Marko M, et al. Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to alphavirus budding. J Virol [Internet]. 2010;84(21):11145-51. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.00036-10>
102. Sariola M, Saraste J, Kuismanen E. Communication of post-Golgi elements with early endocytic pathway: regulation of endoproteolytic cleavage of Semliki Forest virus p62 precursor. J Cell Sci [Internet]. 1995;108 (Pt 6):2465-75. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.108.6.2465>
103. Okeoma CM. Chikungunya Virus: Springer Cham; 2016. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42958-8>.
104. Domingo E, Colin R, Parrish C, Holland JJ. Origin and Evolution of Viruses. 2nd edition ed: Wiley Online Library; 2008.

105. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with RNA virus polymerase. *Gene* [Internet]. 1992;122:281-8. Available from: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90216-C](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90216-C)
106. Luring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* [Internet]. 2010;6(7). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
107. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* [Internet]. 2008;72:1-76. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00401-6).
108. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* [Internet]. 2013;5:299-309. Available from: <https://doi.org/10.2147/CLEP.S34440>
109. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*: CAB International; 1997. p. 1-22.
110. Chen R, Vasilakis N. Dengue--quo tu et quo vadis? *Viruses* [Internet]. 2011;3(9):1562-608. Available from: <https://doi.org/10.3390/v3091562>.
111. Gaunt MW, Sall AA, de Lamballerie X, Falconar AK, Dzhivanian TI, Gould EA. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J Gen Virol* [Internet]. 2001;82(8):1867-76. Available from: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867>
112. Smith CE. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg* [Internet]. 1956;59(10):243-51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13368255>.
113. Vasilakis N, Durbin AP, da Rosa AP, Munoz-Jordan JL, Tesh RB, Weaver SC. Antigenic relationships between sylvatic and endemic dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008;79(1):128-32. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.128>.
114. Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1952;1(1):30-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14903434>.

115. Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. Bull World Health Organ [Internet]. 1980;58(1):1-21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6966540>.
116. Brathwaite Dick O, San Martin JL, Montoya RH, del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. The history of dengue outbreaks in the Americas. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2012;87(4):584-93. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0770>.
117. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. Virology [Internet]. 1990;174(2):479-93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2129562>.
118. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. Virology [Internet]. 2002;303(1):110-9. Available from: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1686>.
119. Rodriguez-Roche R, Villegas E, Cook S, Poh Kim PA, Hinojosa Y, Rosario D, et al. Population structure of the dengue viruses, Aragua, Venezuela, 2006-2007. Insights into dengue evolution under hyperendemic transmission. Infect Genet Evol [Internet]. 2012;12(2):332-44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.005>.
120. Foster JE, Bennett SN, Vaughan H, Vorndam V, McMillan WO, Carrington CV. Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. Virology [Internet]. 2003;306(1):126-34. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00033-8).
121. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. Virology [Internet]. 2004;329(1):168-79. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.003>.
122. Yactayo S, Staples JE, Millot V, Cibrelus L, Ramon-Pardo P. Epidemiology of chikungunya in the Americas. J Infect Dis [Internet]. 2016;214(5):S441-s5. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390>
123. Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. Emerg Infect Dis [Internet]. 2015;21(4):557-61. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2104.141723>
124. Lumsden WH. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. Trans R Soc Trop Med

Hyg [Internet]. 1955;49(1):33-57. Available from: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90081-X)

125. Weinbren MP. The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. II. In man on the Entebbe peninsula. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1958;52(3):258-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13556870>.

126. Coffey LL, Failloux AB, Weaver SC. Chikungunya virus-vector interactions. Viruses [Internet]. 2014;6(11):4628-63. Available from: <https://doi.org/10.3390/v6114628>

127. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. Science [Internet]. 1960;131(3407):1102-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399343>.

128. Myers RM, Carey DE. Concurrent isolation from patient of two arboviruses, chikungunya and dengue type 2. Science [Internet]. 1967;157(3794):1307-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6038994>.

129. Higuera A, Ramírez JD. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and chikungunya arboviruses: An update. Acta Trop [Internet]. 2019;190:99-111. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.010>

130. Gerardin P, Guernier V, Perrau J, Fianu A, Le Roux K, Grivard P, et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. BMC Infect. Dis [Internet]. 2008;8:99. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-99>

131. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. PLoS Med [Internet]. 2006;3(7):e263. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>

132. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLoS Pathog [Internet]. 2007;3(12):e201. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>

133. Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by chikungunya virus and its epidemic emergence. PLoS Pathog [Internet]. 2011;7(12):e1002412. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002412>
134. European climate and health observatory. Chikungunya [Internet] 2022 [updated 2 de abril de 2024]. Available from: <https://climate-adapt.eea.europa.eu/es/observatory/evidence/health-effects/vector-borne-diseases/chikungunya>.
135. Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairède A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. Antiviral Res [Internet]. 2013;99(3):345-70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>
136. Cassadou S, Boucau S, Petit-Sinturel M, Huc P, Leparç-Goffart I, Ledrans M. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. Euro Surveill [Internet]. 2014;19(13). Available from: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20752>
137. Powers AM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. J Virol [Internet]. 2001;75(21):10118-31. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001>
138. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of chikungunya and O'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. J Gen Virol [Internet]. 2000;81(2):471-9. Available from: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>
139. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. Antiviral Res [Internet]. 2015;120:32-9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>
140. Ng LC, Hapuarachchi HC. Tracing the path of chikungunya virus--evolution and adaptation. Infect Genet Evol [Internet]. 2010;10(7):876-85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.012>

141. Dick GWA. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1952;46 521–34. Available from: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90043-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90043-6)
142. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2016;29(3):487-524. Available from: <https://doi.org/10.1128/cmr.00072-15>
143. Boyer S, Calvez E, Chouin-Carneiro T, Diallo D, Failloux AB. An overview of mosquito vectors of Zika virus. Microbes Infect [Internet]. 2018;20(11-12):646-60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
144. Marchette NJ, Garcia R, A. R. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1969;18(3):411-5. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>
145. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A new threat from *Aedes albopictus*? PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014;8(2):e2681. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>
146. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M, Machieng P, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of chikungunya and Zika viruses. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014;8(10):e3188. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003188>
147. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. N Engl J Med [Internet]. 2009;360(24):2536-43. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
148. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparac-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. Euro Surveill [Internet]. 2014;19(9). Available from: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>
149. Hayes EB. Zika virus outside Africa. Emerg Infect Dis [Internet]. 2009;15(9):1347-50. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
150. Organización Panamericana de la Salud. Regional Zika Epidemiological Update (Americas) [Internet] 2017 [updated 25 de agosto de 2017]. Available from:

<https://www.paho.org/en/regional-zika-epidemiological-update-americas-august-25-2017>

151. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012;6(2):e1477. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>
152. Seabra SG, Libin PJK, Theys K, Zhukova A, Potter BI, Nebenzahl-Guimaraes H, et al. Genome-wide diversity of Zika virus: Exploring spatio-temporal dynamics to guide a new nomenclature proposal. *Virus Evol* [Internet]. 2022;8(1):veac029. Available from: <https://doi.org/10.1093/ve/veac029>
153. Marchi S, Viviani S, Montomoli E, Tang Y, Boccuto A, Vicenti I, et al. Zika virus in West Africa: A seroepidemiological study between 2007 and 2012. *Viruses* [Internet]. 2020;12(6). Available from: <https://doi.org/10.3390/v12060641>
154. Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(24):2321-34. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>
155. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet* [Internet]. 2014;384(9954):1571-2. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61977-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61977-2)
156. Organización Panamericana de la Salud. Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis [Internet]. OPS, Washington, D.C. EUA.2016. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31448>.
157. Perez F, Llau A, Gutierrez G, Bezerra H, Coelho G, Ault S, et al. The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2019;24(4):442-53. Available from: <https://doi.org/10.1111/tmi.13200>
158. Organización Mundial de la Salud. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control [Internet] New Edition. Geneva: World Health Organization; 2009. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547871>

159. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. 2013;496(7446):504-7. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
160. Calisher CH. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virol* [Internet]. 1988;32(5):469-78.
161. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2011;16(8):936-48. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02793.x>
162. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanaroj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *Pediatr Infect Dis J* [Internet]. 2007;26(4):283-90; discussion 91-2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414388>.
163. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol* [Internet]. 2003;27(1):1-13. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00010-6)
164. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* [Internet]. 1988;239(4839):476-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3277268>.
165. Grange L, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5:280. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00280>
166. Barrera R, Hunsperger E, Lanciotti RS, Munoz J, Mutebi J-P, Nasci RS, et al. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Pan American Health Organization; National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.). Division of Vector-Borne Diseases [Internet] 2011. Available from: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/22081>.
167. Simon F, Javelle E, Cabie A, Bouquillard E, Troisgros O, Gentile G, et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations).

- November 2014. *Med Mal Infect* [Internet]. 2015. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>
168. Ho PS, Ng MM, Chu JJ. Establishment of one-step SYBR green-based real time-PCR assay for rapid detection and quantification of chikungunya virus infection. *Virology* [Internet]. 2010;7:13. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-13>
169. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, chikungunya virus, and dengue virus. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2016;63(12):1584-90. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw589>
170. Chastel C. Infections inapparentes chez l'Homme: un cheval de Troie pour l'introduction et la diffusion des arbovirus transmis par des moustiques dans les régions non endémiques? *Bull Soc Pathol Exot* [Internet]. 2011;104(3):213-9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13149-011-0165-1>.
171. Sissoko D, Ezzedine K, Moendandze A, Giry C, Renault P, Malvy D. Field evaluation of clinical features during chikungunya outbreak in Mayotte, 2005-2006. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2010;15(5):600-7. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02485.x>
172. Moro ML, Gagliotti C, Silvi G, Angelini R, Sambri V, Rezza G, et al. Chikungunya virus in North-Eastern Italy: a seroprevalence survey. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010;82(3):508-11. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0322>
173. Kumar NP, Suresh A, Vanamail P, Sabesan S, Krishnamoorthy KG, Mathew J, et al. Chikungunya virus outbreak in Kerala, India, 2007: a seroprevalence study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2011;106(8):912-6. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800003>
174. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet* [Internet]. 2012;379(9816):662-71. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60281-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X)
175. Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013;7(3):e2137. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>

176. Javelle E, Ribera A, Degasne I, Gauzere BA, Marimoutou C, Simon F. Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006-2012. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;9(3):e0003603. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003603>
177. Ramachandran V, Malaisamy M, Ponnaiah M, Kaliaperuaml K, Vadivoo S, Gupte MD. Impact of chikungunya on health related quality of life Chennai, South India. PloS One [Internet]. 2012;7(12):e51519. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051519>
178. Brito CAA. Alert: Severe cases and deaths associated with chikungunya in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2017;50. Available from: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0479-2016>
179. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al. Atypical chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. Epidemiol Infect [Internet]. 2009;137(4):534-41. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0950268808001167>
180. Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moscetti F, Ledrans M, et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2009;3(3):e389. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000389>
181. Lima Neto AS, Sousa GS, Nascimento OJ, Castro MC. Chikungunya-attributable deaths: A neglected outcome of a neglected disease. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2019;13(9):e0007575. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007575>
182. DeSilva M, Munoz FM, Sell E, Marshall H, Tse Kawai A, Kachikis A, et al. Congenital microcephaly: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of safety data after maternal immunisation. Vaccine [Internet]. 2017;35(48 Pt A):6472-82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.044>
183. Cerbino-Neto J, Mesquita EC, Souza TM, Parreira V, Wittlin BB, Durovni B, et al. Clinical manifestations of Zika virus infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. Emerg Infect Dis [Internet]. 2016;22(7):1318-20. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2207.160375>

184. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015;21(10):1885-6. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2110.150847>
185. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016;16(6):653-60. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)
186. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, Sacramento GA, Ko AI, Maia M, et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol* [Internet]. 2016;134(5):529-35. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0267>
187. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;374(10):951-8. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1600651>.
188. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika virus and birth defects--reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;374(20):1981-7. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1604338>
189. Pittaluga G. Sobre un brote de dengue en la Habana. *Rev Med Trop Paras Bact Clin y Lab*. 1945;11(1).
190. Guzman MG, Kouri G, Martinez E, Bravo J, Riveron R, Soler M, et al. Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Pan Am. J. Public Health* [Internet]. 1987;21(3):270-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3442718>.
191. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Vald s L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* [Internet]. 1999;3(3):130-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460923>.
192. Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G, et al. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Pan Am. J. Public Health* [Internet]. 1997;1(3):193-9. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/9111>

193. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2002;2(1):33-42. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00171-2).
194. Organización Panamericana de la Salud-Cuba. Brote de dengue en Cuba, 2006. EER Noticias: Enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, Región de Las Américas [Internet]. 2006;3(1). Available from: <https://www3.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/eid-eer-2006-oct-24.htm>
195. Díaz G. Epidemiología molecular de los virus del dengue en Cuba, 2009-2014. [Tesis de Diploma]. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"-Universidad de La Habana; 2014.
196. Organización Panamericana de la Salud. PLISA- Health Information Platform for the Americas. Chikungunya [Internet]. 2023 [updated 3 de marzo de 2024]. Available from: <https://www.paho.org/data/index.php/en/>.
197. Díaz G. Epidemiología molecular de casos importados del virus chikungunya en Cuba, 2014. [Tesis de Maestría]. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2017.
198. Rodhain F, Perez C. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire: Notion d'entomologie des maladies à vecteurs. Paris: Maloine;1985.
199. Aitken TH, Downs WG, Shope RE. *Aedes aegypti* strain fitness for yellow fever virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1977;26(5 Pt 1):985-9. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.985>
200. Gubler DJ, Nalim S, Tan R, Saipan H, Sulianti Saroso J. Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1979;28(6):1045-52. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1979.28.1045>
201. Paupy C, Brengues C, Ndiath O, Toty C, Herve JP, Simard F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2010;10(4):473-80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.001>.
202. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013;108(1):11-7. Available from: <https://doi.org/10.1590/0074-0276130395>

203. Knols BGJ. Review of "Mosquitoes of the World" by Wilkerson RC, Linton YM, Strickman D. Parasit Vectors [Internet]. 2021;14(1):341. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04848-6>.
204. Laporta GZ, Potter AM, Oliveira JFA, Bourke BP, Pecor DB, Linton YM. Global distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a climate change scenario of regional rivalry. Insects [Internet]. 2023;14(1). Available from: <https://doi.org/10.3390/insects14010049>
205. Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MA. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2007;102(5):573-80. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000062>
206. Iwamura T, Guzman-Holst A, Murray KA. Accelerating invasion potential of disease vector *Aedes aegypti* under climate change. Nat Commun [Internet]. 2020;11(1):2130. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16010-4>
207. Ibanez-Bernal S. Nuevo registro altitudinal de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) en México. Folia Entomológica Mexicana. 1987; 72:163-4
208. Lozano-Fuentes S, Hayden MH, Welsh-Rodriguez C, Ochoa-Martinez C, Tapia-Santos B, Kobylinski KC, et al. The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in Mexico. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2012;87(5):902-9. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0244>.
209. Gadelha DP, Toda AT. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1985;37:29-36.
210. Christophers R. *Aedes aegypti* (L.). The Yellow Fever Mosquito. London: Cambridge University Press; 1960.
211. Nelson MJ. *Aedes aegypti*: Biology and ecology. Washington PAHO. COLL/PNSP/86-64; 1986.
212. Degallier N, Herve JP, Travassos da Rosa AP. [*Aedes aegypti* (L.): importance of its bioecology in the transmission of dengue and other arboviruses. II. Bibliography]. Bull Soc Pathol Exot [Internet]. 1988;81(1):111-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3042176>.

213. Felipe Ramírez-Sánchez L, Camargo C, Avila FW. Male sexual history influences female fertility and re-mating incidence in the mosquito vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Insect Physiol [Internet]. 2020;121:104019. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104019>
214. Becker N, Petric' D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Madon M, et al. Mosquitoes and Their Control. Second Edition ed. London: Springer; 2010.
215. Harrington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, et al. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2005;72(2):209-20. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.209>
216. Edman JD, Scott TW, Costero A, Morrison AC, Harrington LC, Clark GG. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. J Med Entomol [Internet]. 1998;35(4):578-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701948>.
217. González R. Culícidos de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2006. 184 p.
218. Weaver SC, Forrester NL, Liu J, Vasilakis N. Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2021;19(3):184-95. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00482-8>
219. Scott TW, Takken W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. Trends Parasitol [Internet]. 2012;28(3):114-21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.001>
220. Bowen MF. The sensory physiology of host-seeking behavior in mosquitoes. Annu Rev Entomol [Internet]. 1991;36:139-58. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.001035>
221. da Silva Paixão K, de Castro Pereira I, Lopes Alves Bottini L, Eduardo Eiras Á. Volatile semiochemical-conditioned attraction of the male yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, to human hosts. J Vector Ecol [Internet]. 2015;40(1):1-6. Available from: <https://doi.org/10.1111/jvec.12143>

222. Klowden MJ. Initiation and termination of host-seeking inhibition in *Aedes aegypti* during oöcyte maturation. J Insect Physiol [Internet]. 1981;27(11):799-803. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022191081900718>.
223. Bohbot JD, Durand NF, Vinyard BT, Dickens JC. Functional development of the octenol response in *Aedes aegypti*. Front Physiol [Internet]. 2013;4:39. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00039>
224. Davis EE. Development of lactic acid-receptor sensitivity and host-seeking behaviour in newly emerged female *Aedes aegypti* mosquitoes. J Insect Physiol [Internet]. 1984;30(3):211-5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022191084900052>.
225. Farjana T, Tuno N. Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol [Internet]. 2013;50(4):838-46. Available from: <https://doi.org/10.1603/ME12146>
226. Chadee DD, Beier JC, Mohammed RT. Fast and slow blood-feeding durations of *Aedes aegypti* mosquitoes in Trinidad. J Vector Ecol [Internet]. 2002;27(2):172-7. Available from: [PMID: 12546453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12546453/).
227. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. Annu Rev Entomol [Internet]. 2008;53:273-91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803458>.
228. James AA. Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. Bull Inst Pasteur. 1994;92:133-50.
229. Fay RW, Perry AS. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. Mosq News [Internet]. 1965;25(3). Available from: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/129217>.
230. Chadee DD, Martinez R, Sutherland JM. *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes in Trinidad, West Indies: longevity case studies. J Vector Ecol [Internet]. 2017;42(1):130-5. Available from: <https://doi.org/10.1111/jvec.12247>
231. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2000;64(1):115-37. Available from: <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.1.115-137.20>

232. Failloux AB, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F. [Genetic control of vectorial competence in *Aedes* mosquitoes]. Bull Soc Pathol Exot [Internet]. 1999;92(4):266-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10572663>.
233. Lounibos LP, Kramer LD. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. J Infect Dis [Internet]. 2016;214(5):453-8. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw285>
234. Thu HM, Aye KM, Thein S. The effect of temperature and humidity on dengue virus propagation in *Aedes aegypti* mosquitos. Southeast Asian J Trop Med Public Health [Internet]. 1998;29(2):280-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886113>.
235. Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A. Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1987;36(1):143-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3812879>.
236. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2006;75(5):886-92. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/75/5/886.full.pdf>.
237. Bosio CF, Beaty BJ, Black WC. Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1998;59(6):965-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886207>.
238. Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc [Internet]. 1988;1:1-39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068349>.
239. Finlay CJ. Mosquitoes considered as transmitters of yellow fever and malaria. Med Rec. 1899;55:737-9.
240. Tabachnick WJ. Evolutionary genetics and arthropod-borne diseases. The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. American Entomologist [Internet]. 1991;37:14-24. Available from: <https://doi.org/10.1093/ae/37.1.14>
241. Scott TW, Amerasinghe PH, Morrison AC, Lorenz LH, Clark GG, Strickman D, et al. Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. J Med Entomol [Internet]. 2000;37(1):89-101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218911>.

242. Harrington LC, Edman JD, Scott TW. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J Med Entomol* [Internet]. 2001;38(3):411-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372967>.
243. Canyon DV, Hii JL, Muller R. Multiple host-feeding and biting persistence of *Aedes aegypti*. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1998;92:311-6. Available from: <https://doi.org/10.1080/00034983.1998.11813295>
244. Klowden MJ, Lea AO. Blood meal size as a factor affecting continued host-seeking by *Aedes aegypti* (L.). *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1978; 27:827-31. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1978.27.827>
245. Reiter P, Gubler DJ. Surveillance and control of urban dengue vectors. . Gubler DJaK, G., editor. UK 1997.
246. Schoof HF. Mating, resting habits and dispersal of *Aedes aegypti*. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1967;36:600-1. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/263319>
247. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc. R. Soc. B.* [Internet]. 2011;278(1717):2446-54. Available from: <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2469>.
248. Pereira TN, Carvalho FD, De Mendonça SF, Rocha MN, Moreira LA. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(4):e0007518. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007518>
249. Krokovsky L, Lins CRB, Guedes DRD, Wallau GDL, Ayres CFJ, Paiva MHS. Dynamic of Mayaro virus transmission in *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* mosquitoes, and a mice model. *Viruses* [Internet]. 2023;15(3). Available from: <https://doi.org/10.3390/v15030799>
250. Yang C, Wang F, Huang D, Ma H, Zhao L, Zhang G, et al. Vector competence and immune response of *Aedes aegypti* for Ebinur Lake virus, a newly classified mosquito-borne orthobunyavirus. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2022;16(7):e0010642. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010642>

251. Aksoy E, Vigneron A, Bing X, Zhao X, O'Neill M, Wu YN, et al. Mammalian African trypanosome VSG coat enhances tsetse's vector competence. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016;113(25):6961-6. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1600304113>
252. Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, McElroy K, Wessely V, Higgs S, et al. Evaluation of the function of a type I peritrophic matrix as a physical barrier for midgut epithelium invasion by mosquito-borne pathogens in *Aedes aegypti*. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2008;8(5):701-12. Available from: <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0270>
253. Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol* [Internet]. 2001;47(2):119-25. Available from: <https://doi.org/10.1002/arch.1042>
254. Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses* [Internet]. 2015;7(7):3741-67. Available from: <https://doi.org/10.3390/v7072795>
255. Yurchenco PD, O'Rear JJ. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 1994;6:674-81. Available from: <https://doi.org/10.3390/v7072795>
256. Romoser WS, Wasieloski LP, Jr., Pushko P, Kondic JP, Lerdthusnee K, Neira M, et al. Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *J Med Entomol* [Internet]. 2004;41:467-75. Available from: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.467>
257. Passarelli AL. Barriers to success: How baculoviruses establish systemic infections. *Virology* [Internet]. 2011; 411:383-92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.009>
258. Vega-Rúa A, Schmitt C, Bonne I, Krijnse Locker J, Failloux AB. Chikungunya virus replication in salivary glands of the mosquito *Aedes albopictus*. *Viruses* [Internet]. 2015;7(11):5902-7. Available from: <https://doi.org/10.3390/v7112917>
259. Sanchez-Vargas I, Olson KE, Black WCt. The genetic basis for salivary gland barriers to arboviral transmission. *Insects* [Internet]. 2021;12(1). Available from: <https://doi.org/10.3390/insects12010073>
260. Coffey LL, Forrester N, Tsetsarkin K, Vasilakis N, Weaver SC. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future*

- Microbiol [Internet]. 2013;8(2):155-76. Available from: <https://doi.org/10.2217/fmb.12.139>
261. Pierro DJ, Powers EL, Olson KE. Genetic determinants of Sindbis virus strain TR339 affecting midgut infection in the mosquito *Aedes aegypti*. J Gen Virol [Internet]. 2007 88:1545-54. Available from: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82577-0>
262. Khoo CC, Doty JB, Held NL, Olson KE, Franz AW. Isolation of midgut escape mutants of two American genotype dengue 2 viruses from *Aedes aegypti*. Virol J [Internet]. 2013;10(1):257. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-257>
263. Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. Viruses [Internet]. 2014;6(10):3991-4004. Available from: <https://doi.org/10.3390/v6103991>
264. Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. Viruses [Internet]. 2014;6:4479-504. Available from: <https://doi.org/10.3390/v6114479>
265. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog [Internet]. 2008;4(7):e1000098. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-257>
266. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 2009;106(42):17841-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764916/pdf/zpq17841.pdf>.
267. Olson KE, Blair CD. Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. Curr Opin Virol [Internet]. 2015;15:119-26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.001>
268. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. 2001;356(1411):983-9. Available from: <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
269. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. Nature [Internet]. 2008;451(7181):990-3. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

270. Weaver SC, Barrett AD. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2004;2(10):789-801. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>.
271. Vasilakis N, Cardoso J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(7):532-41. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2595>.
272. Pereira-Dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, Paupy C. A systematic review: is *Aedes albopictus* an efficient bridge vector for zoonotic arboviruses? *Pathogens* [Internet]. 2020;9(4). Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens9040266>
273. Valentine MJ, Murdock CC, Kelly PJ. Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit Vectors* [Internet]. 2019;12(1):463. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3732-0>
274. Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, Rossi SL, Richman RL, Vasilakis N. Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.008>.
275. Weaver SC. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch Virol Suppl* [Internet]. 2005;(19):33-44. Available from: https://doi.org/10.1007/3-211-29981-5_4
276. Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res* [Internet]. 2012;94(3):242-57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>
277. Althouse BM, Guerbois M, Cummings DAT, Diop OM, Faye O, Faye A, et al. Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. *Nature Commun* [Internet]. 2018;9(1):1046. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03332-7>.
278. Kilbourn AM, Karesh WB, Wolfe ND, Bosi EJ, Cook RA, Andau M. Health evaluation of free-ranging and semi-captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah,

- Malaysia. J Wildl Dis [Internet]. 2003;39(1):73-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12685070>.
279. Wolfe ND, Kilbourn AM, Karesh WB, Rahman HA, Bosi EJ, Cropp BC, et al. Sylvatic transmission of arboviruses among *Bornean orangutans*. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2001;64(5-6):310-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463123>.
280. Evans TS, Aung O, Cords O, Coffey LL, Wong T, Weiss CM, et al. Sylvatic transmission of chikungunya virus among nonhuman primates in myanmar. Emerg Infect Dis [Internet]. 2022;28(12):2548-51. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2812.220893>
281. Moreira-Soto A, Carneiro IO, Fischer C, Feldmann M, Kümmerer BM, Silva NS, et al. Limited evidence for infection of urban and peri-urban nonhuman primates with Zika and chikungunya viruses in Brazil. mSphere [Internet]. 2018;3(1). Available from: <https://doi.org/10.1128/msphere.00523-17>
282. Althouse BM, Hanley KA, Diallo M, Sall AA, Ba Y, Faye O, et al. Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in Senegal. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2015;92(1):88-97. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0617>
283. Rezza G. *Aedes albopictus* and the reemergence of dengue. BMC public health [Internet]. 2012;12:72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398301/pdf/1471-2458-12-72.pdf>.
284. Huang Y-M, ed Contributions to the Mosquito Fauna of Southeast Asia. XIV. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Asia I - the scutellaris group of species [Internet] 1972. Available from: <https://books.google.com.cu/books?id=KMEbzwEACAAJ>
285. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. PloS One [Internet]. 2007;2(11):e1168. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>

286. Fine PE. Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1975;266:173-94. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35099.x>
287. Salazar MI, Richardson JH, Sanchez-Vargas I, Olson KE, BJ. B. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol* [Internet]. 2007;7:9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797809/pdf/1471-2180-7-9.pdf>
288. Krow-Lucal ER, Biggerstaff BJ, Staples JE. Estimated incubation period for Zika virus disease. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017;23(5):841-5. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2305.161715>
289. Hery L, Boullis A, Delannay C, Vega-Rúa A. Transmission potential of African, Asian and American Zika virus strains by *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Guadeloupe (French West Indies). *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2019;8(1):699-706. Available from: <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1615849>
290. Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PloS One* [Internet]. 2013;8(3):e59716. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601061/pdf/pone.0059716.pdf>
291. Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PloS One* [Internet]. 2009;4(6):e5895. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005895>
292. Severson DW, Behura SK. Genome investigations of vector competence in *Aedes aegypti* to inform novel arbovirus disease control approaches. *Insects* [Internet]. 2016;7(58). Available from: <https://doi.org/10.3390/insects7040058>
293. Choochote W, Tippawangkosol P, Jitpakdi A, Sukontason KL, Pitasawat B, Sukontason K, et al. Polygamy: the possibly significant behavior of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to the efficient transmission of dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* [Internet]. 2001;32(4):745-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12041548>

294. Fauran P, Laille M, Moreau JP. [Study on the vertical transmission of the dengue virus in the South Pacific]. Bull Soc Pathol Exot [Internet]. 1990;83(3):311-6. Available from: [PMID: 2208461](#).
295. Golding MAJ, Noble SAA, Khouri NK, Layne-Yarde RNA, Ali I, Sandiford SL. Natural vertical transmission of dengue virus in Latin America and the Caribbean: highlighting its detection limitations and potential significance. Parasit Vectors [Internet]. 2023;16(1):442. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06043-1>.
296. Cao-Lormeau VM, Roche C, Aubry M, Teissier A, Lastere S, Daudens E, et al. Recent emergence of dengue virus serotype 4 in French Polynesia results from multiple introductions from other South Pacific Islands. PloS One [Internet]. 2011;6(12):e29555. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029555>.
297. Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, et al. Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-2013. Virol J [Internet]. 2014;11:61. Available from: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-61>
298. Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araujo FM, De Simone SG, Dutra RF, et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceara, Brazil. PloS One [Internet]. 2012;7(7):e41386. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405123/pdf/pone.0041386.pdf>.
299. Martinez NE, Dzul-Manzanilla F, Gutierrez-Castro C, Ibarra-Lopez J, Bibiano-Marin W, Lopez-Damian L, et al. Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. J Am Mosq Control Assoc [Internet]. 2014;30(2):143-6. Available from: <https://doi.org/10.2987/14-6402.1>
300. Thongrunskiat S, Wasinpiyamongkol L, Maneekan P, Prummongkol S, Samung Y. Natural transovarial dengue virus infection rate in both sexes of dark and pale forms of *Aedes aegypti* from an urban area of Bangkok, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health [Internet]. 2012;43(5):1146-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431820>.
301. Arunachalam N, Tewari SC, Thenmozhi V, Rajendran R, Paramasivan R, Manavalan R, et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in

- Chennai, Tamil Nadu, India. Indian J Med Res [Internet]. 2008;127(4):395-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18577796>.
302. Rosen L. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1988;39(1):123-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840833>.
303. Chan AS, Sherman C, Lozano RC, Fernandez EA, Winch PJ, Leontsini E. Development of an indicator to evaluate the impact, on a community-based *Aedes aegypti* control intervention, of improved cleaning of water-storage containers by householders. Ann Trop Med Parasitol [Internet]. 1998;92(3):317-29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713548>.
304. Chen CF, Shu PY, Teng HJ, Su CL, Wu JW, Wang JH, et al. Screening of dengue virus in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by one-step SYBR green-based reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay during 2004-2007 in Southern Taiwan. Vector Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2010;10(10):1017-25. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/vbz.2008.0069>.
305. Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1998;58(5):578-86. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.578>
306. Vikram K, Nagpal BN, Pande V, Srivastava A, Saxena R, Singh H, et al. Detection of dengue virus in individual *Aedes aegypti* mosquitoes in Delhi, India. J Vector Borne Dis [Internet]. 2015;52(2):129-33. Available from: https://journals.lww.com/jvbd/fulltext/2015/52020/detection_of_dengue_virus_in_individual_aedes.4.aspx
307. Goncalves DDS, Hue KDT, Thuy VT, Tuyet NV, Thi GN, Thi Thuy VH, et al. Assessing the vertical transmission potential of dengue virus in field-reared *Aedes aegypti* using patient-derived blood meals in Ho Chi Minh City, Vietnam. Parasit Vectors [Internet]. 2020;13(1):468. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04334-5>
308. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, RB. T. Vertical transmission of zika virus in *Aedes aegypti* mosquitoes. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2016;95(5):1169-73. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0448>

309. Lee HL, Rohani A. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an Urban Area in Malaysia. *Dengue Bull* [Internet]. 2005;29:106-11.
310. Thongrungrat S, Maneekan P, Wasinpiyamongkol L, Prummongkol S. Prospective field study of transovarial dengue-virus transmission by two different forms of *Aedes aegypti* in an urban area of Bangkok, Thailand. . *J Vector Ecol* [Internet]. 2011;36(1):147-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635652>.
311. Kramer LD, Ebel GD. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res* [Internet]. 2003;60:187-232. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60006-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60006-0)
312. Thompson WH, BJ. B. Venereal transmission of La Crosse (California encephalitis) arbovirus in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Science* [Internet]. 1977;196(4289):530-1. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.850794>
313. Ovenden JR, RJ. M. Venereal transmission of Sindbis virus between individuals of *Aedes australis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* [Internet]. 1984;21(3):292-5. Available from: <https://doi.org/10.1093/jmedent/21.3.292>
314. Mourya DT, Soman RS. Venereal transmission of Japanese encephalitis virus in *Culex bitaeniorhynchus* mosquitoes. *Indian J Med Res* [Internet]. 1999;109:202-3. Available from: [PMID: 10491910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10491910/)
315. Mavale M, Parashar D, Sudeep A, Gokhale M, Ghodke Y, Geevarghese G, et al. Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010;83(6):1242-4. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0577>
316. Tu WC, Chen CC, Hou RF. Ultrastructural studies on the reproductive system of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with dengue 2 virus. *J Med Entomol* [Internet]. 1998;35(1):71-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542348>.
317. Sánchez-Vargas I, Harrington LC, Doty JB, Black WCt, Olson KE. Demonstration of efficient vertical and venereal transmission of dengue virus type-2 in a genetically diverse laboratory strain of *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018;12(8):e0006754. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006754>

318. Pereira-Silva JW, Nascimento VAd, Belchior HCM, Almeida JF, Pessoa FAC, Naveca FG, et al. First evidence of Zika virus venereal transmission in *Aedes aegypti* mosquitoes. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2018;113. Available from: <https://doi.org/10.1590/0074-02760170329>
319. Campos SS, Fernandes RS, Dos Santos AAC, de Miranda RM, Telleria EL, Ferreira-de-Brito A, et al. Zika virus can be venereally transmitted between *Aedes aegypti* mosquitoes. Parasit Vectors [Internet]. 2017;10(1):605. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2543-4>
320. Rosen L. Sexual transmission of dengue viruses by *Aedes albopictus*. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1987;37(2):398-402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3661831>.
321. Kuno G. Transmission of arboviruses without involvement of arthropod vectors. Acta Virol [Internet]. 2001;45(3):139-50. Available from: [PMID: 11774892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11774892/)
322. Grobusch MP, van der Fluit KS, Stijns C, De Pijper CA, Hanscheid T, Gautret P, et al. Can dengue virus be sexually transmitted? Travel Med Infect Dis [Internet]. 2020;38:101753. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101753>
323. Chye JK, Lim CT, Ng KB, Lim JM, George R, Lam SK. Vertical transmission of dengue. Clin Infect Dis [Internet]. 1997;25(6):1374-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431381>.
324. Staples JE, Fischer M. Chikungunya virus in the Americas--what a vectorborne pathogen can do. N Engl J Med [Internet]. 2014;371(10):887-9. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMp1407698>
325. Blitvich BJ, Magalhaes T, Laredo-Tiscareño SV, Foy BD. Sexual transmission of arboviruses: A systematic review. Viruses [Internet]. 2020;12(9). Available from: <https://doi.org/10.3390/v12090933>
326. Magalhaes T, Foy BD, Marques ETA, Ebel GD, J. W-L. Mosquito-borne and sexual transmission of Zika virus: Recent developments and future directions. Virus Res [Internet]. 2017;254:1-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.011>.

327. Cao B, Diamond MS, Mysorekar IU. Maternal-fetal transmission of Zika virus: Routes and signals for infection. J Interferon Cytokine Res [Internet]. 2017;37(7):287-94. Available from: <https://doi.org/10.1089/jir.2017.0011>
328. Gaceta Oficial de la República de Cuba. Decreto-Ley 302 del 11 de octubre del 2012, modificativo de la Ley No. 1312 "Ley de Migración", del veinte de septiembre de 1976. La Habana, Cuba;2012.
329. Oficina Nacional de Estadística e Información. Anuario Estadístico de Arroyo Naranjo 2015 [Internet]. 2016. Available from: https://istmat.org/files/uploads/63420/anuario_estadistico_de_cuba_2015.pdf
330. Dirección Municipal de Salud Pública Arroyo Naranjo. Base de datos: Índice casa para *Aedes aegypti*. La Habana, Cuba; 2010-2015.
331. Focks D. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. UNICEF/UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)[Internet]. 2004;TDR / IDE / Den / 03.1. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/68575>
332. Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus-IPK. Base de Datos: Diagnóstico serológico de dengue. La Habana, Cuba;2013-2014.
333. Ministerio de Salud Pública-Cuba. Informe Interno. La Habana, Cuba;2013.
334. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología La Habana. Base de datos: Casos de dengue y Zika. La Habana, Cuba;2009-2017.
335. Ministerio de Salud Pública-Cuba. Manual de Normas y Procedimientos en Vigilancia y Lucha Antivectorial. La Habana2012.
336. MapInfo Corp. v11.0. Pitney Bowes Software Inc;2011.
337. Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, et al. Manual de indicaciones técnicas para insectarios. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas; 2004.
338. Gomes AC. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programa de vigilância entomológica. Informe Epidemiológico do Sus [Internet]. 1998;7:49-57. Available from: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-16731998000300006&nrm=iso.

339. GraphPad Prism version 10.0.0 for Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com
340. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol [Internet]. 1992;30(3):545-51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617>.
341. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 1977;74(12):5463-7. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.546>
342. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1990.
343. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerg Infect Dis [Internet]. 2008;14(8):1232-9. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>
344. Espinosa M, Giamperetti S, Abril M, Seijo A. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Puerto Iguazu, Misiones, Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2014;56(2):165-7. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200013>
345. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. Available from: <http://www.R-project.org/>
346. Mahy BWJ, Kangro HO. Virology methods manual: London ; San Diego : Academic Press;1996.
347. Vega Rua A. Émergence du virus chikungunya en Amérique et en Europe [Internet] [Tesis de Doctorado] París, France: Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2015. Available from: <https://theses.hal.science/tel-01341062>
348. Callahan JD, Wu SJ, Dion Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. J Clin Microbiol [Internet].

- 2001;39(11):4119-24. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4119-4124.2001>
349. Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008;14(3):416-22. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>
350. Mohamed Ali S, Amroun A, de Lamballerie X, Nougairède A. Evolution of chikungunya virus in mosquito cells. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):16175. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34561-x>.
351. Baronti C, Piorkowski G, Leparç-Goffart I, de Lamballerie X, Dubot-Peres A. Rapid next-generation sequencing of dengue, EV-A71 and RSV-A viruses. *J Virol Methods* [Internet]. 2015;226:7-14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.09.004>
352. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1997;24:4876-82. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
353. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* [Internet]. 1999;41 95-8.
354. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2016;33(7):1870-4. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
355. Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ, Barbagallo CB. Preparation of PCR products for DNA sequencing. *Biotechniques* [Internet]. 1998;24(2):314-7. Available from: <https://doi.org/10.2144/98242pf01>
356. Centre d'expertise et de services Génome Québec. Sanger Sequencing User Guide [Internet]. 2016. Available from: https://genomequebec.com/wp-content/uploads/2024/02/UserGuide_CES_SNP_SangerSequencing_4.3_En.pdf
357. Ayres CFJ, Guedes DRD, Paiva MHS, Morais-Sobral MC, Krokovsky L, Machado LC, et al. Zika virus detection, isolation and genome sequencing through *Culicidae* sampling

- during the epidemic in Vitória, Espírito Santo, Brazil. Parasit Vectors [Internet]. 2019;12(1):220. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3461-4>
358. Silva S, Paiva MHS, Guedes DRD, Krovovsky L, Melo FL, Silva M, et al. Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. Sci Rep [Internet]. 2019;9(1):4494. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40960-5>
359. Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, et al. Outbreak of Zika virus infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and first confirmed transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes in The Americas. J Infect Dis [Internet]. 2016;214(9):1349-56. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw302>
360. Grubaugh ND, Saraf S, Gangavarapu K, Watts A, Tan AL, Oidtman RJ, et al. Travel surveillance and genomics uncover a hidden Zika outbreak during the waning epidemic. Cell [Internet]. 2019;178(5):1057-71.e11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.018>
361. Allicock OM, Sahadeo N, Lemey P, Auguste AJ, Suchard MA, Rambaut A, et al. Determinants of dengue virus dispersal in the Americas. Virus Evol [Internet]. 2020;6(2):veaa074. Available from: <https://doi.org/10.1093/ve/veaa074>
362. Giovanetti M, Milano T, Alcantara LC, Carcangiu L, Cella E, Lai A, et al. Zika virus spreading in South America: Evolutionary analysis of emerging neutralizing resistant Phe279Ser strains. Asian Pac J Trop Med [Internet]. 2016;9(5):445-52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516300281>.
363. Mourya DT, Gokhale MD, Basu A, Barde PV, Sapkal GN, Padbidri VS, et al. Horizontal and vertical transmission of dengue virus type 2 in highly and lowly susceptible strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. Acta Virol [Internet]. 2001;45(2):67-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719984>.
364. Bisset JA, Marquetti MC, García A, Vandelerberghe V, Leyva M, Van der Stuyft P, et al. [Pupal surveillance of *Aedes aegypti* as a tool for control of the vector in a municipality with low density of La Habana City, Cuba]. Rev Biomed [Internet]. 2008;19:92-103.

365. Marquetti MC, Suarez S, Bisset J, Leyva M. [Report of habitats used by *Aedes aegypti* in Havana City, Cuba]. *Rev Cuba Med Trop* [Internet]. 2005;57(2):159-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17966589>.
366. Stoddard ST, Forshey BM, Morrison AC, Paz-Soldan VA, Vazquez-Prokopec GM, Astete H, et al. House-to-house human movement drives dengue virus transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2013;110(3):994-9. Available from: <http://www.pnas.org/content/110/3/994.full.pdf>.
367. Reiner RC, Stoddard ST, Scott TW. Socially structured human movement shapes dengue transmission despite the diffusive effect of mosquito dispersal. *Epidemics* [Internet]. 2014;6:30-6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2013.12.003>
368. Garcia-Luna SM, Weger-Lucarelli J, RuËckert C, Murrieta RA, Young MC, Byas AD, et al. Variation in competence for ZIKV transmission by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018;12(7). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006599>
369. Calvez E, Guillaumot L, Girault D, Richard V, O'Connor O, Paoaafaite T, et al. Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017;10(381). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2319-x>
370. Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WCt. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* [Internet]. 2000;156(2):687-98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014816>.
371. Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge JM, Lourenco-De-Oliveira R, et al. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci* [Internet]. 2014;281(1792). Available from: <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1078>
372. Aubry F, Dabo S, Manet C, Filipović I, Rose NH, Miot EF, et al. Enhanced Zika virus susceptibility of globally invasive *Aedes aegypti* populations. *Science* [Internet]. 2020;370(6519):991-6. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abd3663>

373. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? Trends Parasitol [Internet]. 2011;27(3):111-4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.001>.
374. Powell JR. An evolutionary perspective on vector-borne diseases. Front Genet [Internet]. 2019;10:1266. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01266>
375. Day JF. Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: lessons from recent, and not so recent, outbreaks. Annu Rev Entomol [Internet]. 2001;46:111-38. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.46.1.111>
376. Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotopranoto S, Konishi E. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008-2011. JPN J Infect Dis [Internet]. 2012;65(3):274-6. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/65/3/65_274/pdf.
377. Alexander TC, Sean MB, Steven DZ, Matthew B, Dylan JE, Madeline NM, et al. Effects of Zika virus strain and *Aedes* mosquito species on vector competence. Emerg Infect Dis [Internet]. 2017;23(7). Available from: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/7/16-1633>.
378. Calvez E, O'Connor O, Pol M, Rousset D, Faye O, Richard V, et al. Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. Emerg Microbes Infect [Internet]. 2018;7(1):159. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0166-2>
379. Thavara U, Siriyasatien P, Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Anantapreecha S, Wongwanich R, et al. 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. Southeast Asian J Trop Med Public Health [Internet]. 2006;37(3):468-76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120966>.
380. Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz MI, Jaramillo JF, Vargas SL, et al. Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2016;111(4):233-40. Available from: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150363>

381. Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BB, et al. Recent introduction and rapid dissemination of chikungunya virus and dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito co-infections in Gabon, Central Africa. Clin Infect Dis [Internet]. 2012. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/cis530>
382. Vogels CBF, Rückert C, Cavany SM, Perkins TA, Ebel GD, Grubaugh ND. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? PLoS Biol [Internet]. 2019;17(1):e3000130. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000130>
383. Reiter P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. Vector Borne Zoonotic Dis [Internet]. 2007;7(2):261-73. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/vbz.2006.0630>.
384. Wong J, Stoddard ST, Astete H, Morrison AC, TW S. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2011;5(4):e1015. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001015>
385. Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. BMC Microbiol [Internet]. 2008;8:28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2259308/pdf/1471-2180-8-28.pdf>.
386. Muturi EJ, Buckner E, Bara J. Superinfection interference between dengue-2 and dengue-4 viruses in *Aedes aegypti* mosquitoes. Trop Med Int Health [Internet]. 2017;4:399-406. Available from: <https://doi.org/10.1111/tmi.12846>
387. Figueiredo RM, Naveca FG, Oliveira CM, Bastos Mde S, Mourao MP, Viana Sde S, et al. Co-infection of dengue virus by serotypes 3 and 4 in patients from Amazonas, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2011;53(6):321-3. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v53n6/a04v53n6.pdf>.
388. Guo RN, Lin JY, Li LH, Ke CW, He JF, Zhong HJ, et al. The prevalence and endemic nature of dengue infections in guangdong, South China: An epidemiological, serological, and etiological study from 2005-2011. PloS One [Internet]. 2014;9(1):e85596. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085596>

389. Shroyer DA. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc [Internet]. 1990;6(2):312-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2196337>.
390. Zhang Q, Jiang Y, Li C, Gao J, Zhao T, Zhang H, et al. Survival and replication of Zika virus in diapause eggs of *Aedes albopictus* from Beijing, China. Front Microbiol [Internet]. 2022;13:924334. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.924334>
391. Kuno G, Mackenzie JS, Junglen S, Hubálek Z, Plyusnin A, Gubler DJ. Vertebrate reservoirs of arboviruses: myth, synonym of amplifier, or reality? Viruses [Internet]. 2017;9(7). Available from: <https://doi.org/10.3390/v9070185>
392. Souza UJB, Macedo YSM, Santos RNd, Cardoso FDP, Galvão JD, Gabev EE, et al. Circulation of dengue virus serotype 1 genotype V and dengue virus serotype 2 genotype III in Tocantins state, northern Brazil, 2021–2022. Viruses [Internet]. 2023;15(11):2136. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/11/2136>.
393. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. J Gen Virol [Internet]. 1997;78 2279-84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292015>.
394. A-Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai le Q, et al. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. Virology [Internet]. 2004 329(2):505-12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.029>
395. Angel A, Angel B, V. J. Rare occurrence of natural transovarial transmission of dengue virus and elimination of infected foci as a possible intervention method. Acta Trop [Internet]. 2016;155 20-4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.018>
396. Terry H, Figueredo R, Martinez S, Armando J, Trigo J, Antuna T, et al. [Preliminary report on the national extermination campaign of *Aedes (S) aegypti* in the Republic of Cuba (31 May 1981 to 20 March 1982)]. Zeitschrift fur die gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete [Internet]. 1984;30(12):737-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6528672>.
397. Marquetti MC, Gonzalez D, Aguilera L, Navarro A. [Ecologic indexes in the surveillance system of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cuba]. Rev Cuba Med Trop

- [Internet]. 1999;51(2):79-82. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601999000200003&lng=es&nrm=iso. ISSN 1561-3054.
398. Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, et al. Differential susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from The Americas to Zika virus. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016;10(3):e0004543. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004543>
399. Roundy CM, Azar SR, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Variation in *Aedes aegypti* competence for Zika virus transmission. Emerg Infect Dis [Internet]. 2017;23:625–32. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2304.161484>
400. Joanne S, Vythilingam I, Teoh BT, Leong CS, Tan KK, Wong ML, et al. Vector competence of Malaysian *Aedes albopictus* with and without *Wolbachia* to four dengue virus serotypes. Trop Med Int Health [Internet]. 2017; 22(9):1154-65. Available from: <https://doi.org/10.1111/tmi.12918>
401. Poole-Smith BK, Hemme RR, Delorey M, Felix G, Gonzalez AL, Amador M, et al. Comparison of vector competence of *Aedes mediiovittatus* and *Aedes aegypti* for dengue virus: implications for dengue control in the Caribbean. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;9(2):e0003462. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003462>
402. Weaver SC. Incrimination of mosquito vectors. Nat Microbiol [Internet]. 2020;5:232–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0665-5>
403. Miller BR, Monath TP, Tabachnick WJ, Ezike VI. Epidemic yellow fever caused by an incompetent mosquito vector. Trop Med Parasit [Internet]. 1989;40:396-99. Available from: [PMID: 2623418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2623418/)
404. Marquetti MC, Pérez M, Mendizábal ME, Peraza I, Chamizo K, Bisset JA, et al. Spatial and temporal distribution of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Havana, Cuba. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 2019;113:S99-S140. Available from: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:000493064400328>
405. Weaver SC, Lorenz LH, TW. S. Distribution of western equine encephalomyelitis virus in the alimentary tract of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) following natural and

- artificial blood meals. J Med Entomol [Internet]. 1993;30:397-7. Available from: <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.2.391>
406. Jupp PG, McIntosh BM, Blackburn NK. Experimental assessment of the vector competence of *Culex (Culex) neavei* Theobald with West Nile and Sindbis viruses in South Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1986;80(2): 226-30. Available from: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90019-2).
407. Meyer RP, Hardy JL, SB. P. Comparative vector competence of *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* from the Coachella, Imperial, and San Joaquin Valleys of California for St. Louis encephalitis virus. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1983;32(2):305-11. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.305>
408. Azar SR, Weaver SC. Vector competence: what has Zika virus taught us? Viruses [Internet]. 2019;11(9). Available from: <https://doi.org/10.3390/v11090867>
409. Chamberlain RW, Kissling RE, RK. S. Studies on the North American arthropod-borne encephalitides. VII. Estimation of amount of eastern equine encephalitis virus inoculated by infected *Aedes aegypti*. Am J Hyg [Internet]. 1954;60(286-291). Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119722>
410. Smith DR, Carrara AS, Aguilar PV, SC W. Evaluation of methods to assess transmission potential of Venezuelan equine encephalitis virus by mosquitoes and estimation of mosquito saliva titers. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2005;73(1):33-9. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.33>
411. Styer LM, Kent KA, Albright RG, Bennett CJ, Kramer LD, KA. B. Mosquitoes inoculate high doses of West Nile virus as they probe and feed on live hosts. PLoS Pathog [Internet]. 2007;3(9):1262-70. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030132>
412. Maciel-de-Freitas R, Eiras AE, Lourenco-de-Oliveira R. Calculating the survival rate and estimated population density of gravid *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. Cad Saúde Públ [Internet]. 2008;24(12):2747-54. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200003>.
413. Joy TK, Jeffrey Gutierrez EH, Ernst K, Walker KR, Carriere Y, Torabi M, et al. Aging field collected *Aedes aegypti* to determine their capacity for dengue transmission in the

- southwestern United States. PloS One [Internet]. 2012;7(10):e46946. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3470585/pdf/pone.0046946.pdf>.
414. Armstrong PM, Ehrlich HY, Magalhaes T, Miller MR, Conway PJ, Bransfield A, et al. Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. Nat Microbiol [Internet]. 2020;5(2):239-47. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0619-y>
415. Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. J Virol [Internet]. 2014;88(11):6294-306. Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.00370-14>
416. Honório NA, Wiggins K, Câmara DCP, Eastmond B, BW A. Chikungunya virus vector competency of Brazilian and Florida mosquito vectors. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2018;12(6):e0006521. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006521>
417. Alto BW, Wiggins K, Eastmond B, Velez D, Lounibos LP, CC L. Transmission risk of two chikungunya lineages by invasive mosquito vectors from Florida and the Dominican Republic. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2017;11(7):e0005724. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005724>
418. Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. Future Microbiol [Internet]. 2011;6(3):265-77. Available from: <https://doi.org/10.2217/fmb.11.11>
419. Sanchez-Vargas I, Harrington LC, Black WC IV, KE O. Analysis of salivary glands and saliva from *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* infected with chikungunya viruses. Insects [Internet]. 2019;10(39). Available from: <https://doi.org/10.3390/insects10020039>
420. Chen WJ, Wei HL, Hsu EL, Chen ER. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) to dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. J Med Entomol [Internet]. 1993;30(3):524-30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8510112>.
421. González R, Marro E. *Aedes albopictus* in Cuba. J Am Mosq Control Assoc [Internet]. 1999;15:569-70. Available from: [PMID: 10612621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10612621/)

422. Pereira-dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, C. P. A systematic review: is *Aedes albopictus* an efficient bridge vector for zoonotic arboviruses? Pathogens [Internet]. 2020;9(266). Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens9040266>
423. Ruiz A. Detección de los virus del dengue en estadios inmaduros de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1984) de La Habana, 2019. [Tesis de Maestría]. La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”; 2022.
424. Ponlawat H, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. J Med Entomol [Internet]. 2005;42(5):844-9. Available from: <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.5.844>
425. Richards SL, Ponnusamy L, Unnasch TR, Hassan HK, Apperson CS. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central north Carolina. J Med Entomol [Internet]. 2006;43(3):543-51. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:23466844>
426. Marquetti MC, Castillo M, Peraza I, Milian M, Molina R, Leyva M, et al. *Aedes albopictus* (Skuse) dispersion in Havana City, Cuba, 1995-2018. Acta Trop [Internet]. 2023;240:106839. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106839>
427. Obadia T, Gutierrez-Bugallo G, Duong V, Nuñez AI, Fernandes RS, Kamgang B, et al. Zika vector competence data reveals risks of outbreaks: the contribution of the European ZIKAlliance project. Nat Commun [Internet]. 2022;13(1):4490. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32234-y>
428. Gabiane G, Bohers C, Mousson L, Obadia T, Dinglasan RR, Vazeille M, et al. Evaluating vector competence for yellow fever in the Caribbean. Nature Commun [Internet]. 2024;15(1):1236. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45116-2>.
429. Tahir MJ, Sawal I, Essar MY, Jabbar A, Ullah I, Ahmed A. Disease X: A hidden but inevitable creeping danger. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2022;43(11):1758-9. Available from: <https://doi.org/10.1017/ice.2021.342>
430. Vidal Ledo MJ, Armenteros Vera I, Aparicio Suárez JL, Morales Suárez I, Portuondo Sao M. Una Salud. Educac Méd Super [Internet]. 2021;35. Available from:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21412021000200018&nrm=iso.

431. Gutiérrez-Bugallo G, Rodríguez-Roche R, Díaz G, Pérez M, Mendizábal ME, Peraza I, et al. Spatio temporal distribution of vertically transmitted dengue viruses by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Arroyo Naranjo, Havana, Cuba. Trop Med Int Health [Internet]. 2018;23(12):1342-9. Available from: <https://doi.org/10.1111/tmi.13162>
432. da Costa C, dos Passos RA, Pereira JB, Roque RA, de Souza V, Bonifácio T, et al. Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomonitoring. Parasit Vectors [Internet]. 2017;10(249). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2194-5>
433. Nag DK, Payne AF, Dieme C, Ciota AT, Kramer LD. Zika virus infects *Aedes aegypti* ovaries. Virology [Internet]. 2021;561:58-64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.06.002>
434. Thavara U, Tawatsin A, Pengsakul T, Bhakdeenuan P, Chanama S, Anantapreecha S, et al. Outbreak of chikungunya fever in Thailand and virus detection in field population of vector mosquitoes, *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). Southeast Asian J Trop Med Public Health [Internet]. 2009;40(5):951-62. Available from: [PMID: 19842379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19842379/)
435. Castro MG, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Lourenco-de-Oliveira R. Dengue virus detection by using reverse transcription-polymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected *Aedes albopictus* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2004;99(8):809-14. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v99n8/v99n8a05.pdf>
436. Bosio CF, Thomas RE, Grimstad PR, Rai KS. Variation in the efficiency of vertical transmission of dengue-1 virus by strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol [Internet]. 1992;29(6):985-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1460640>.
437. Buckner EA, Alto BW, Lounibos LP. Vertical transmission of Key West dengue-1 virus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from Florida. J Med Entomol [Internet]. 2013;50(6):1291-7. Available from: <https://doi.org/10.1603/ME13047>

438. Lee HL, Mustafakamal I, Rohani A. Does transovarial transmission of dengue virus occur in Malaysian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*? Southeast Asian J Trop Med Public Health [Internet]. 1997;28(1):230-2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9322311>.
439. Pacidônio EC, Caragata EP, Alves DM, Marques JT, Moreira LA. The impact of *Wolbachia* infection on the rate of vertical transmission of dengue virus in Brazilian *Aedes aegypti*. Parasit Vectors [Internet]. 2017;10(1):296. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2236-z>
440. Ciota AT, Bialosuknia SM, Ehrbar DJ, Kramer LD. Vertical transmission of Zika virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. Emerg Infect Dis [Internet]. 2017;23(5):880-2. Available from: <https://doi.org/10.3390/insects14030289>
441. Phumee A, Chomposri J, Intayot P, Boonserm R, Boonyasuppayakorn S, Buathong R, et al. Vertical transmission of Zika virus in *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. Sci Rep [Internet]. 2019;9(1):5257. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41727-8>.
442. Li C., Guo X., Deng Y., Xing D., Sun A., Liu Q., et al. Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. Emerg Microbes Infect [Internet]. 2017 6:e23. Available from: <https://doi.org/10.1038/emi.2017.8>
443. Francy DB, Rush WA, Montoya M, Inglish DS, Bolin RA. Transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus by *Culex pipiens* complex mosquitoes. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1981;30(3):699-705. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.699>
444. Baqar S, Hayes CG, Murphy JR, Watts DM. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1993;48(6):757-62. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.757>
445. Hardy JL, Rosen L, Kramer LD, Presser SB, Shroyer DA, Turell MJ. Effect of rearing temperature on transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus in mosquitoes. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1980;29(5):963-8. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.963>

446. Hayes CG, Baker RH, Baqar S, Ahmed T. Genetic variation for West Nile virus susceptibility in *Culex tritaeniorhynchus*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1984;33(4):715-24. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.715>
447. Molina-Cruz A, Gupta L, Richardson J, Bennett K, Black Wt, Barillas-Mury C. Effect of mosquito midgut trypsin activity on dengue-2 virus infection and dissemination in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2005;72(5):631-7. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/72/5/631.full.pdf>
448. Mondotte JA, Gausson V, Frangeul L, Suzuki Y, Vazeille M, Mongelli V, et al. Evidence for long-lasting transgenerational antiviral immunity in insects. *Cell Rep* [Internet]. 2020;33(11):108506. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108506>
449. Vastenhouw NL, Brunschwig K, Okihara KL, Müller F, Tijsterman M, Plasterk RH. Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nature* [Internet]. 2006;442(7105):882. Available from: <https://doi.org/10.1038/442882a>
450. Tesh RB. Transovarial Transmission of Arboviruses in Their Invertebrate Vectors. In: KF. H, editor. *Current topics in vector research*. New-York: NY: Praeger; 1984. p. 57–76.
451. Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses* [Internet]. 2015;7(9):4911-28. Available from: <https://doi.org/10.3390/v7092851>
452. Teixeira AF, de Brito BB, Correia TML, Viana AIS, Carvalho JC, da Silva FAF, et al. Simultaneous circulation of zika, dengue, and chikungunya viruses and their vertical co-transmission among *Aedes aegypti*. *Acta Trop* [Internet]. 2021;215:105819. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105819>
453. Guedes DR, Cordeiro MT, Melo-Santos MA, Magalhaes T, Marques E, Regis L, et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. *J Vector Borne Dis* [Internet]. 2010;47(2):67-75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539043>.
454. Hoz Berdugo AJ. Factores sociales y del entorno y su diferenciación ante dengue grave y dengue en el Departamento del Atlántico 2015-2019 [Internet] [Tesis de

- Maestría]. Barranquilla, Colombia:Universidad del Norte; 2022. Available from: <http://hdl.handle.net/10584/10724>
455. Ruiz Pérez J, Vega Barrios F. Comportamiento epidemiológico del dengue y dengue grave relacionado con factores sociales y demográficos en el departamento de Sucre, 2019 [Internet] [Tesis de Maestría] Colombia: Universidad de Sucre;2022. Available from: <https://repositorio.unisucra.edu.co/handle/001/1744>
456. Ocampo Mallou C, Folguera G ¿Epidemiología social del dengue en Argentina? Letras Verdes [Internet]. 2022;31:7-24. Available from: <https://doi.org/10.17141/letrasverdes.31.2022.5055>
457. Hernández Y, Castro M, Pérez S, Pérez A, Lloyd LS, Pérez D. [Communication for arboviral disease prevention: tailoring PAHO initiatives to the Cuban context]. Rev Panam Salud Públ [Internet]. 2018;42:e146. Available from: <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.146>
458. Pérez D, Robert E, Pérez EJ, Vanlerberghe V, Lefèvre P, Ridde V. A realist synthesis of community-based interventions in vector-borne diseases. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2021;104(4):1202-10. Available from: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/104/4/article-p1202.xml>.
459. Sánchez L, Pérez D, Alfonso L, Castro M, Sánchez LM, Van der Stuyft P, et al. [A community education strategy to promote participation in dengue prevention in Cuba]. Rev Panam Salud Públ [Internet]. 2008;24(1):61-9. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892008000700008
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/9961>
460. Mosquera M, Obregón R, L L, Orozco M, A. P. Comunicación, participación y movilización: Impacto de una intervención comunitaria para la prevención y control de la transmisión de la fiebre de dengue. Quórum Académico [Internet]. 2010;3(1):11-33. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199016766002>
461. Mourya DT. Absence of transovarial transmission of chikungunya virus in *Aedes aegypti* & *Ae. albopictus* mosquitoes. Indian J Med Res [Internet]. 1987;85:593-5. Available from: [PMID: 3666861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3666861/)

462. Chompoosri J, Thavara U, Tawatsin A, Boonserm R, Phumee A, Sangkitporn S, et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016;9:227. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1505-6>
463. Honório NA, Wiggins K, Eastmond B, Câmara DCP, Alto BW. Experimental vertical transmission of chikungunya virus by Brazilian and Florida *Aedes albopictus* populations. *Viruses* [Internet]. 2019;11(4). Available from: <https://doi.org/10.3390/v11040353>
464. Bellini R, Medici A, Calzolari M, Bonilauri P, Cavrini F, Sambri V, et al. Impact of Chikungunya virus on *Aedes albopictus* females and possibility of vertical transmission using the actors of the 2007 outbreak in Italy. *PloS One* [Internet]. 2012;7(2):e28360. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028360>
465. Gloria-Soria A, Brackney DE, Armstrong PM. Saliva collection via capillary method may underestimate arboviral transmission by mosquitoes. *Parasit Vectors* [Internet]. 2022;15(1):103. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05198-7>
466. Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus-IPK. Base de datos: Diagnóstico virológico molecular de dengue. La Habana, Cuba;2013-2015.
467. Alvarez M, Diaz D, Martinez R, Mesa EM, Santana E, Caballero Y, et al. Secondary infection and viral infection sequences involved in the severity of dengue. 5th Pan-American Dengue Research; Panamá 2016.
468. Pérez OL. Infección asintomática por dengue en un área de salud del municipio Habana del Este, 2012 [Tesis de Maestría] La Habana, Cuba: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"; 2013.
469. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2008;102(6):522-3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.001>.
470. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2006;75(6):1113-7. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh>.

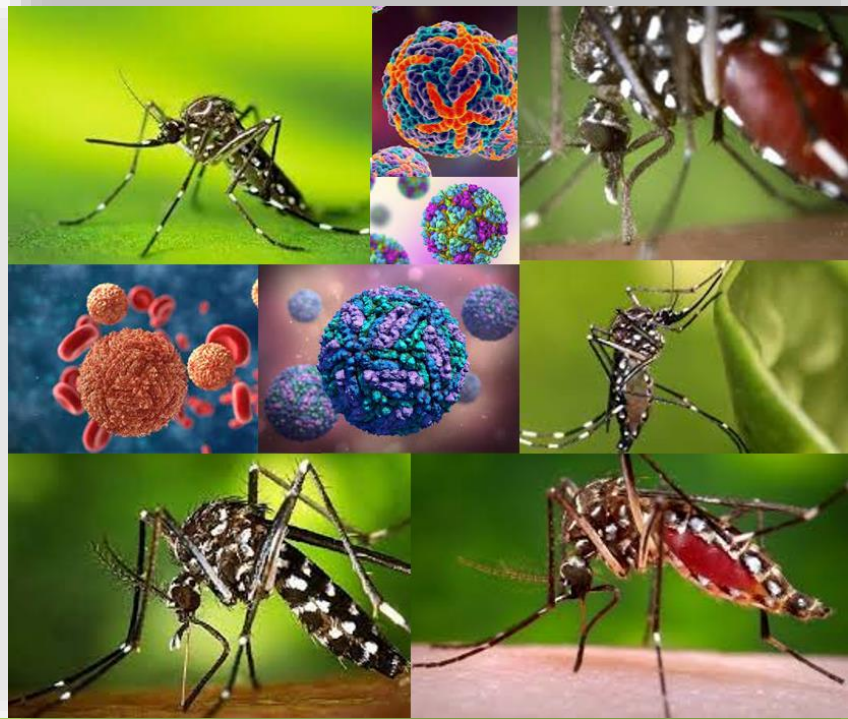
471. Guzman MG, Kouri G, Valdes L, Bravo J, Vazquez S, Halstead SB. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Públ* [Internet]. 2002;11(4):223-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049030>.
472. Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2015;112(47):14688-93. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1508114112>
473. Ferreira-de-Lima VH, Andrade PdS, Thomazelli LM, Marrelli MT, Urbinatti PR, Almeida RMMdS, et al. Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):3855. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60870-1>.
474. Grubaugh ND, Sharma S, Krajacich BJ, Fakoli LS, III, Bolay FK, Diclaro JW, II, et al. Xenosurveillance: a novel mosquito-based approach for examining the human-pathogen landscape. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(3):e0003628. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003628>
475. Organización Panamericana de la Salud. Technical document for the implementation of interventions based on generic operational scenarios for *Aedes aegypti* control [Internet]. 2019. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51652>.
476. Dzul-Manzanilla F, Correa-Morales F, Che-Mendoza A, Palacio-Vargas J, Sánchez-Tejeda G, González-Roldan JF, et al. Identifying urban hotspots of dengue, chikungunya, and Zika transmission in Mexico to support risk stratification efforts: a spatial analysis. *Lancet Planet Health* [Internet]. 2021;5(5):e277-e85. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00030-9)
477. Dos Reis IC, Gibson G, Ayllón T, de Medeiros Tavares A, de Araújo JMG, da Silva Monteiro E, et al. Entomo-virological surveillance strategy for dengue, Zika and chikungunya arboviruses in field-caught *Aedes* mosquitoes in an endemic urban area of the Northeast of Brazil. *Acta Trop* [Internet]. 2019;197:105061. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105061>
478. Leandro AS, Ayala MJC, Lopes RD, Martins CA, Maciel-de-Freitas R, Villela DAM. Entomo-virological *Aedes aegypti* surveillance applied for prediction of dengue

- transmission: a spatio-temporal modeling study. *Pathogens* [Internet]. 2022;12(1). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105061>
479. Ndiaye EH, Diallo D, Fall G, Ba Y, Faye O, Dia I, et al. Arboviruses isolated from the Barkedji mosquito-based surveillance system, 2012-2013. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018;18(1):642. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3538-2>.
480. Cruz ACR, Hernández LHA, Aragão CF, da Paz TYB, da Silva SP, da Silva FS, et al. The importance of entomo-virological investigation of yellow fever virus to strengthen surveillance in Brazil. *Trop Med Infect* [Internet]. 2023;8(6). Available from: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8060329>
481. Ayllón T, Campos RM, Brasil P, Morone FC, Câmara DCP, Meira GLS, et al. Early evidence for Zika virus circulation among *Aedes aegypti* mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2017;23(8):1411-2. Available from: <https://doi.org/10.3201/eid2308.162007>
482. Watts DM, Pantuwatana S, DeFoliart GR, Yuill TM, Thompson WH. Transovarial transmission of LaCrosse virus (California encephalitis group) in the mosquito, *Aedes triseriatus*. *Science* [Internet]. 1973;182(4117):1140-1. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.182.4117.1140>
483. Beaty BJ, Thompson WH. Delineation of La Crosse virus in developmental stages of transovarially infected *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1976;25(3):505-12. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1976.25.505>
484. Miller BR, DeFoliart GR, Yuill TM. Vertical transmission of La Crosse virus (California encephalitis group): transovarial and filial infection rates in *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* [Internet]. 1977;14(4):437-40. Available from: <https://doi.org/10.1093/jmedent/14.4.437>
485. Patrican LA, DeFoliart GR, Yuill TM. La Crosse viremias in juvenile, subadult and adult chipmunks (*Tamias striatus*) following feeding by transovarially-infected *Aedes triseriatus*. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 1985;34(3):596-602. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.596>
486. Turell MJ, Hardy JL, Reeves WC. Stabilized infection of California encephalitis virus in *Aedes dorsalis*, and its implications for viral maintenance in nature. *Am J Trop*

- Med Hyg [Internet]. 1982;31:1252-9. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.1252>
487. Lai Z, Zhou T, Zhou J, Liu S, Xu Y, Gu J, et al. Vertical transmission of Zika virus in *Aedes albopictus*. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2020;14(10):e0008776. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008776>
488. Lorenz L, Beaty BJ, Aitken TH, Wallis GP, Tabachnick WJ. The effect of colonization upon *Aedes aegypti* susceptibility to oral infection with yellow fever virus. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1984;33(4):690-4. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1984.33.690>
489. Drouin A, Chevalier V, Durand B, Balenghien T. Vector competence of Mediterranean mosquitoes for Rift Valley Fever virus: A meta-analysis. Pathogens [Internet]. 2022;11(5). Available from: <https://doi.org/10.3390/pathogens11050503>
490. Gutiérrez-Bugallo G, Boullis A, Martinez Y, Hery L, Rodríguez M, Bisset JA, et al. Vector competence of *Aedes aegypti* from Havana, Cuba, for dengue virus type 1, chikungunya, and Zika viruses. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2020;14(12):e0008941. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008941>
491. Armstrong PM, Rico-Hesse R. Efficiency of dengue serotype 2 virus strains to infect and disseminate in *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2003;68(5):539-44. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/68/5/539.full.pdf>
492. Lambrechts L, Fansiri T, Pongsiri A, Thaisomboonsuk B, Klungthong C, Richardson JH, et al. Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. J Virol [Internet]. 2012;86(3):1853-61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264336/pdf/zjv1853.pdf>
493. Baidaliuk A, Miot EF, Lequime S, Moltini-Conclois I, Delaigue F, Dabo S, et al. Cell-fusing agent virus reduces arbovirus dissemination in *Aedes aegypti* mosquitoes *in vivo*. J Virol [Internet]. 2019;93(18). Available from: <https://doi.org/10.1128/jvi.00705-19>
494. Nadim SS, Ghosh I, Martcheva M, Chattopadhyay J. Impact of venereal transmission on the dynamics of vertically transmitted viral diseases among mosquitoes. Math Biosci [Internet]. 2020;325:108366. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2020.108366>

495. Chan M, Johansson MA. The incubation periods of dengue viruses. PloS One [Internet]. 2012;7(11):e50972. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3511440/pdf/pone.0050972.pdf>.
496. Ridenhour B, Kowalik JM, Shay DK. El número reproductivo básico (R_0): consideraciones para su aplicación en la salud pública. Am J Public Health [Internet]. 2018;108(6):S455-65. Available from: <https://doi.org/10.2105/AJPH.2013.301704s>
497. Abelló Ugalde IA, R GD, Morales Lezca W. El modelo SIR básico y políticas antiepidémicas de salud pública para la COVID-19 en Cuba. Rev Cub Salud Publica [Internet]. 2020;46(e2597). Available from: <https://www.scielo.org/article/rcsp/2020.v46suppl1/e2597/#ModalArticles>
498. Viglietta M, Bellone R, Blisnick AA, Failloux AB. Vector specificity of arbovirus transmission. Front Microbiol [Internet]. 2021;12:773211. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773211>
499. Barillas-Mury C, Ribeiro JMC, Valenzuela JG. Understanding pathogen survival and transmission by arthropod vectors to prevent human disease. Science [Internet]. 2022;377(6614):eabc2757. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abc2757>
500. Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. Role of the vector in arbovirus transmission. Annu Rev Virol [Internet]. 2014;1(1):71-88. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085513>
501. Vanchiere JA, Ruiz JC, Brady AG, Kuehl TJ, Williams LE, Baze WB, et al. Experimental Zika virus infection of neotropical primates. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2018;98(1):173-7. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0322>
502. Coffey LL, Pesavento PA, Keesler RI, Singapuri A, Watanabe J, Watanabe R, et al. Zika virus tissue and blood compartmentalization in acute infection of *Rhesus* macaques. PloS One [Internet]. 2017;12(1):e0171148. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171148>.
503. Le Coupanec A, Babin D, Fiette L, Jouvion G, Ave P, Misse D, et al. *Aedes* mosquito saliva modulates Rift Valley fever virus pathogenicity. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2013;7(6):e2237. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002237>

504. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, et al. Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2016;94(6):1362-9. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111>



Anexos

ANEXOS

Anexo 1.1 Fórmula y significado de la capacidad vectorial (CaV) de un sistema vectorial dado. Tomado de⁽²³³⁾.

$$CaV = \frac{ma^2 (TI * TT)p^n}{-\ln p}$$

Donde

CaV: capacidad vectorial de un vector para transmitir un patógeno determinado

m: densidad del vector en relación al hospedero vertebrado

a: probabilidad diaria de picada (dada por el índice de preferencia de hospedero multiplicado por la frecuencia de alimentación del vector)

TI: tasa de infección con un patógeno dado (proporción de vectores infectados)

TT: tasa de transmisión de un patógeno dado (proporción de vectores infectados que son capaces de transmitir el patógeno a un hospedero)

(TI * TT): competencia vectorial o proporción de vectores que, luego de alimentarse sobre un hospedero infectado, son capaces de transmitir la infección a un nuevo hospedero.

p: probabilidad diaria de supervivencia del vector

n: duración del periodo de incubación extrínseco

1/-ln p: probabilidad de sobrevivencia de un vector al periodo de incubación extrínseco

Anexo 2.1. Población y fondo habitacional por áreas de salud del municipio Arroyo Naranjo en 2013.

Área de Salud	Manzanas	Universo (Viviendas + locales)	Población humana
Mantilla	227	14891	45077
Párraga	255	15199	40960
Grimau	189	10645	36328
Los Pinos	226	10380	32141
Capri	183	11976	31741
Eléctrico	177	9128	30145
Managua	103	7116	18223
Total	1360	79335	234615

Fuentes: (329)

Anexo 2.2 Datos socio-geográficos de las áreas de salud Pasteur (municipio Diez de Octubre) y Párraga (municipio Arroyo Naranjo), de La Habana, Cuba, durante 2018.

Área de salud	Población humana	Extensión territorial muestreada	Total de Manzanas muestreadas	Universo (Viviendas + locales)
Pasteur	24091	94,22 Ha	106	8544
Párraga	40960	92,61 Ha	130	15199

Fuentes: (329)

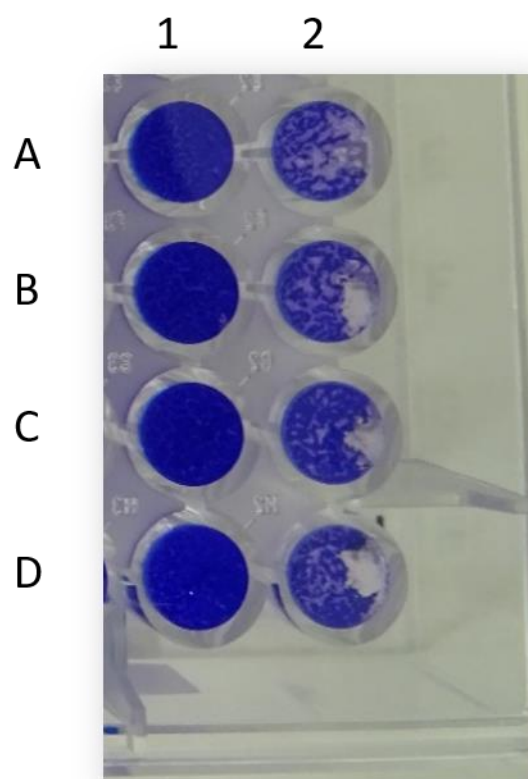
Anexo 2.3. Cebadores utilizados para amplificar el gen *c-prm* y serotipificar los virus del dengue, adaptada de⁽³⁴⁰⁾.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Posición en el genoma	Talla del amplicón (pb)	Serotipo
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161	-	-
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 (D1-TS1)	VDEN-1
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 (D1-TS2)	VDEN-2
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 (D1-TS3)	VDEN-3

Anexo 2.4. Cebadores utilizados para la amplificación específica del virus Zika durante la secuenciación nucleotídica de su genoma completo

Cebador *	Secuencia (5'-3')	Talla del amplicón (bp)
VZIK- 1S	AGTTGTTGATCTGTGTGAGTCAG	939
VZIK-940R	AATCAGCAGTATCATGACCAAGT	
VZIK-882S	TTAGCAGCAGCTGCCATCGC	1001
VZIK-1883R	GGTACACARGGAGTATGACACG	
VZIK-1785S	GCTGGAGCTCTGGAGGCTG	958
VZIK-2743R	ATCCCACAACGACCGTCAGTT	
VZIK-2708S	GGAGCTCAACGCAATCCTGGA	1116
VZIK- 3824R	TGTCCAATTAGCTCTGAAGATG	
VZIK-3581S	AGTGCTTGTGATTCTGCTCATGGT	990
VZIK-4571R	GTACCACGCTCCAGCTGCA	
VZIK-4525S	TGGTCCTGATGACCATCTGTG	1075
VZIK-5600R	GGTGTCCATAATTGGTGAGTTG	
VZIK-5422S	TACTACAGCCAATYAGAGTCC	1107
VZIK-6529R	CGAGGTTGTCAATGGCTTCCT	
VZIK-6388S	CGAGGTGGATGGAYGCCAGAG	1124
VZIK-7512R	CACAAAGTGGAAGTTGCSGCTGT	
VZIK-7329S	ACGGCAGCTGGCATCATGAAG	886
VZIK-8215R	TGCTGGTGTATGGGCACAACA	
VZIK-8138S	AGAAGCACGGACGCTCAGAG	1005
VZIK-9143R	CATCCAGTGATCCTCGTTCAAG	
VZIK-8935S	CAGTGGAAGCTGTGAACGATC	1375
VZIK-10310R	GTGGATAGGTARTCCATGTAC	
VZIK-10220S	TCTCATAGGGCACAGACCGC	422
VZIK-10642R	TCCCTCTTCTGGAGATCCAC	

*La numeración del cebador es acorde a la posición de su base 5' en la secuencia KJ776791.2

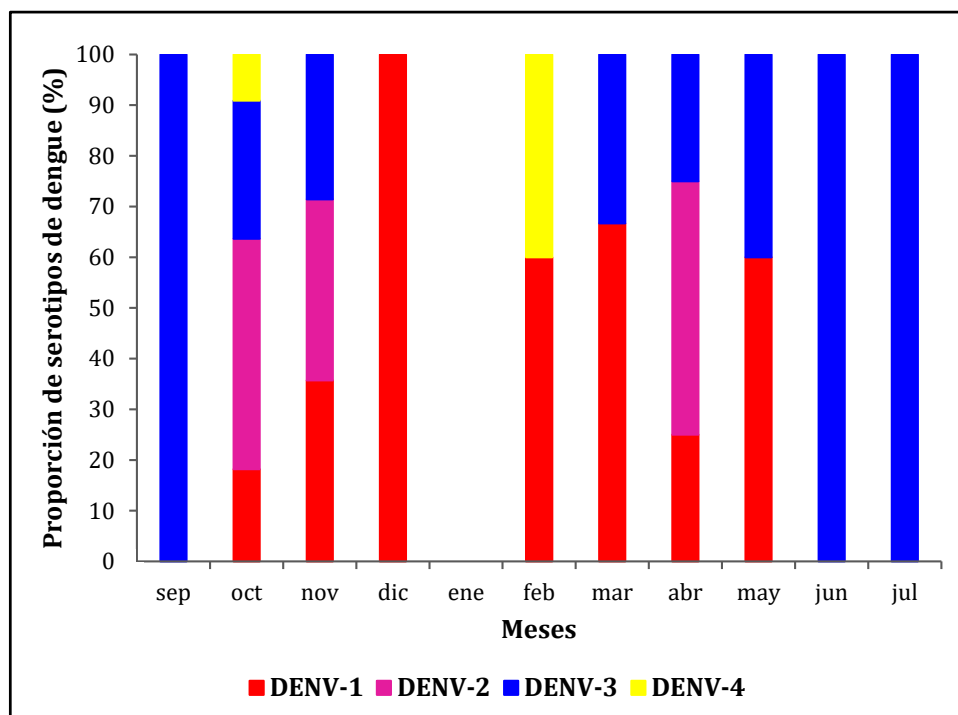


Anexo 2.5 Efecto citopático (columna 2) en monocapa de células Vero expuestas al homogenado de cabezas de hembras de *Aedes aegypti* infectadas con virus Zika (cepa KU955592). La columna 1 representa el control negativo del ensayo que consistió en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino 2%.

Anexo 2.6 Cebadores utilizados para la amplificación específica del virus Chikungunya durante la secuenciación nucleotídica de su genoma completo (tomado de ⁽³⁵⁰⁾)

Cebador *	Secuencia (5'-3')	Talla del amplicón (bp)
Chik-1S	ATGGCTGCGTGAGACACAC	1487
Chik-1488R	TGTATGGGATCAGGTCGGTT	
Chik-1332S	GCAGAAAACACACACGGTCT	1811
Chik-3143R	TGAGACCACTGCCTATCATTTA	
Chik-3067S	GACCTTCGATACATTCCAAA	1505
Chik-4572R	CACGCGAACAATATCGCAGT	
Chik-4546S	CAAGTAGAGCTGCTGGATGA	1756
Chik-6302R	CACGTTGAATACTGCTGAGT	
Chik-6224S	ACACACTACAGAATGTACTGGCA	1487
Chik-7711R	TGGCTTCTGTTGGGGTACCG	
Chik-7673S	CCAGCTGATCTCAGCAGTTA	1204
Chik-8877R	CGTACATGAGTGACTAATCTTCCT	
Chik-8797S	CAGCACCGTGTACGATTACTGG	1680
Chik-10477R	TGTCGAAAGGTGTCCAGGCTG	
Chik-10390S	GAAATAACATCACTGTAAGTCC	880
Chik-11270R	GCCTGCTGAACGACACGCAT	

*La numeración del cebador es acorde a la posición de su base 5' en la secuencia MW281311.1

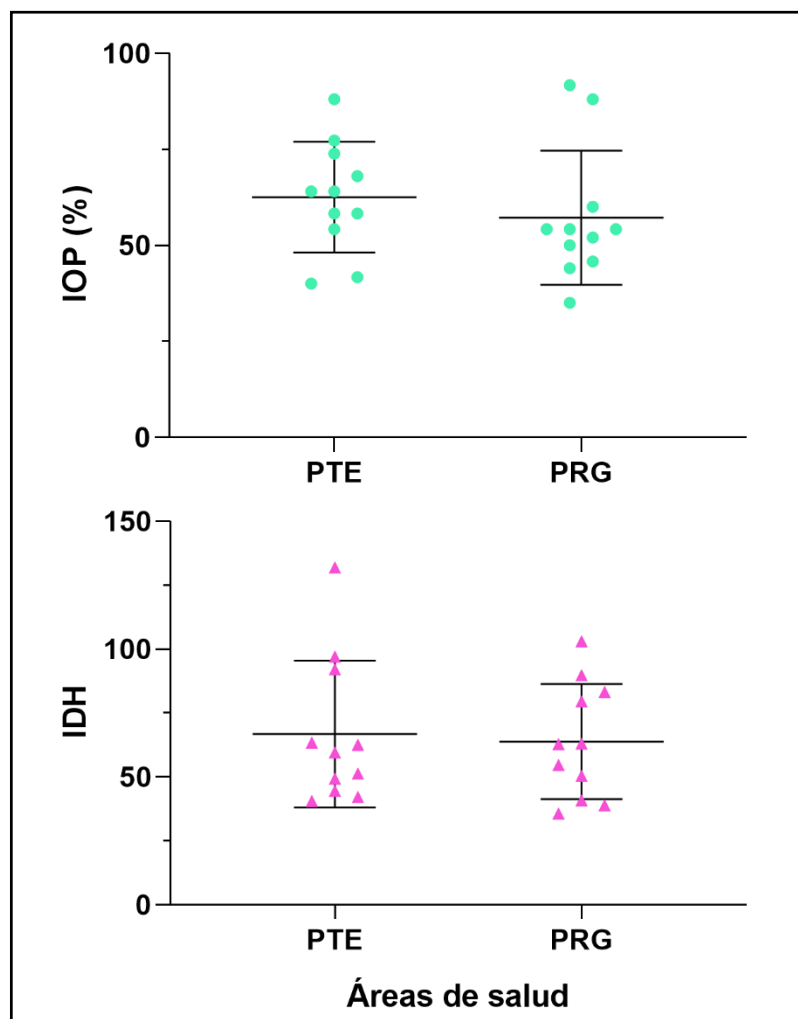


Anexo 3.1. Variación temporal de la proporción de los virus del dengue detectados en los grupos de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* en Arroyo Naranjo durante septiembre 2013-julio 2014.

Anexo 3.2. Secuencias nucleotídicas de los virus del dengue obtenidas de las muestras de *Aedes aegypti* inmaduros colectadas en las áreas de salud de Arroyo Naranjo durante 2013-2014.

Nombre	Serotipo	Área de salud/fecha	Secuencia nucleotídica
D1_Pga_2013	VDEN-1	Párraga/ octubre-2013	TTCTAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATTTTGG CTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATAGAGCGA TCAAAGTGTTACGAGGTTTCAAAAAAGAGATCT CAAGCATGTTGAACATAATGAACAGGAGGAAAA GATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCCA CAGCCCTGGCGTTCCATTTGACCACACGAGGGG GAGAGCCACACATGATAGTTAGTGAGCAGGAAA GAGGAAAGTCACTCTTGTTTAAGACCTCTGCAG GTGTCAATATG
D1_LP_2014	VDEN-1	Los Pinos/ febrero-2014	TTCTAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATTTTGG CTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATAGAGCGA TCAAAGTGTTACGAGGTTTCAAAAAAGAGATCT CAAGCATGTTGAACATAATGAACAGGAGGAAAA GATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCCA

			CAGCCCTGGCGTTCCATTTGACCACACGAGGGG GAGAGCCACACATGATAGTTAGTAAGCAGGAAA GAGGAAAGTCACTCTTGTTTAAGACCTCTGCAG GTGTCAATATG
D1_Grm_2014	VDEN-1	Grimau/ abril- 2014	TTCTAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATTTTGG CTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATAGAGCGA TCAAAGTGTTACGAGGTTTCAAAAAAGAGATCT CAAGCATGTTGAACATAATGAACAGGAGGAAAA GATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCTGCCCA CAGCCCTGGCGTTCCATTTGACCACACGAGGGG GAGAGCCACACATGATAGTTAGTAAGCAGGAAA GAGGAAAGTCACTCTTGTTTAAGACCTCTGCAG GTGTCAATATG
D3_Mlla_2013	VDEN-3	Mantilla/ septiembre- 2013	ACTATCTATATGCTGAAACGCGTGAGAAACCGA GGGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAGATT CTCAAAAGGACTGCTGAACGGCCAGGGACCAA TGAAATTGGTTATGGCGTTCATAGCTTTCTCAG ATTTCTAGCCATTCCACCAACAGCAGGAGTTCTG GCTAGATGGGGAACCTTCAAGAAGTCGGGGGCC ATTAAGGTCCTGAAAGGCTTCAAGAAGGAGATCT CAGACATGCTGAGCATAATCAACAC
D4_Mlla_2013	VDEN-4	Mantilla/ octubre-2013	TCTATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGGTATC AACCCTCAAGGGTTGGTGAAGAGATTCTCAACC GGACTTTTTTCTGGGAAAGGACCCTTACAGATGG TGCTAGCATTATCACGTTTTTGCAGTCTTTTCCA TCCCACCAACAGCAGGGATTCTGAAGAGATGGGG ACAGTTGAAGAAAAATAAGGCCATCAAGATACTG ATTGGATTGAGGAAGGAGATAGGCCGCATGCTGA ACATCTTGAACGGGAGAAAAAGGTCAACGATAAC ATTATTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGGCGTTTCA CTTGTCAACAAGAGATGGCGAACCCTCATGATAG



Anexo 3.3 Índices de ovitrampa positiva (IOP) y densidad de huevos (IDH) de *Aedes aegypti* estimados en las áreas de salud Pasteur (PTE) y Párraga (PRG) durante los 11 meses de estudio (mayo 2018- marzo 2019). Se representan los valores de cada índice por mes y la media \pm la desviación estándar para cada área de salud.

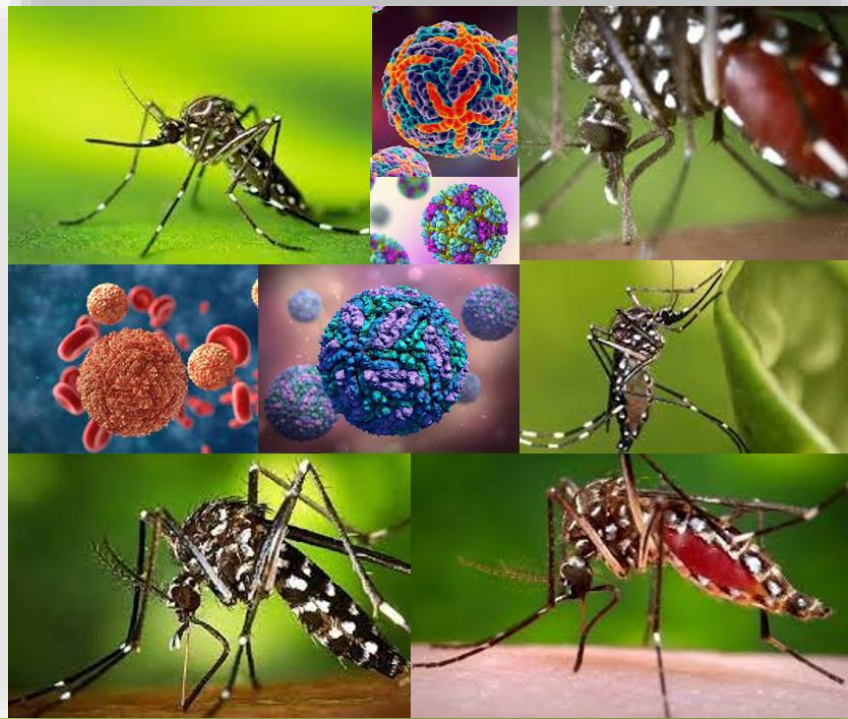
Anexo 3.4 Secuencias nucleotídicas de los virus dengue-1, chikungunya y Zika recuperadas de la descendencia de madres infectadas durante los ensayos de transmisión vertical.

Virus	Descendencia (tipo de muestra)	Secuencia nucleotídica o número de acceso al GenBank

VCHIK	Hija (Saliva)	OR488125
VZIK	Grupo de descendientes 1er CG	<p>Fragmento 1 (2066 bp, de nt 2705 a 4770, genes <i>ns1-ns2</i>)</p> <p>GCAATCCTGGAAGAGAATGGAGTTCAACTGACGGTCGTTGTGGG ATCTGTAAAAAACCCCATGTGGAGAGGTCCACAGAGATTGCCCG TGCCTGTGAACGAGCTGCCCCACGGCTGGAAGGCTTGGGGGAAA TCGTACTTCGTCAGAGCAGCAAAGACAAATAACAGCTTTGTCGT GGATGGTGACACACTGAAGGAATGCCCACTCAAACATAGAGCA TGGAACAGCTTTCTTGTGGAGGATCATGGGTTTCGGGGTATTTAC ACTAGTGTCTGGCTCAAGGTTAGAGAAGATTATTCATTAGAGTG TGATCCAGCCGTTATTGGAACAGCTGTTAAGGGAAAGGAGGCT GTACACAGTGATCTAGGCTACTGGATTGAGAGTGAGAAGAATGA CACATGGAGGCTGAAGAGGGGCCATCTGATCGAGATGAAAACA TGTGAATGGCCAAAGTCCCACACATTGTGGACAGATGGAATAG AAGAGAGTGATCTGATCATACCCAAGTCTTTAGCTGGGCCACTC AGCCATCACAAATACCAGAGAGGGCTACAGGACCCAAGTGAAG GGCCATGGCACAGTGAAGAGCTTGAAATTCGGTTTGAGGAATGC CCAGGCACTAAGGTCCACGTGGAGGAAACATGTGGAACAAGAG GACCATCTCTGAGATCAACCACTGCAAGCGGAAGGGTGATCGA GGAATGGTGCTGCAGGGAGTGCACAATGCCCCCACTGTCTGTTCT GGGCTAAAGATGGCTGTTGGTATGGAATGGAGATAAGGCCCGAG GAAAGAACCAGAAAGCAACTTAGTAAGGTCAATGGTGACTGCAG GATCAACTGATCACATGGATCACTTCTCCCTTGAGAGTCTTGTA TTCTGCTCATGGTGCAGGAAGGGCTGAAGAAGAGAATGACCACA AAGATCATCATAAGCACATCAATGGCAGTGCTGGTAGCTATGAT CCTGGGAGGATTTTCAATGAGTGACCTGGCTAAGCTTGCAATTTT GATGGGTGCCACCTTCGCGGAAATGAACACTGGAGGAGATGTAG CTCATCTGGCGCTGATAGCGGCATTCAAAGTCAGACCAGCGTTGC TGGTATCTTTCATCTTCAGAGCTAATTGGACACCCCGTGAAAGCA TGCTGCTGGCCTTGGCCTCGTGTCTTTTGCAAAGTGCATCTCTG CCTTGAAGGCGACCTGATGGTTCTCATCAATGGTTTTGCTTTGG CCTGGTTGGCAATACGAGCGATGGTTGTTCCACGCACTGACAAC ATCACCTTGGCAATCCTGGCTGCTCTGACACCACTGGCCCCGGGGC ACACTGCTTGTGGCGTGGAGAGCAGGCCTTGCTACTTGCGGGGGG TTTATGCTCCTCTCTCTGAAGGGAAAAGGCAGTGTGAAGAAGAAC TTACCATTTGTCATGGCCCTGGGACTAACCGCTGTGAGGCTGGTC GACCCCATCAACGTGGTGGGACTGCTGTTGCTCACAAGGAGTGGG AAGCGGAGCTGGCCCCCTAGCGAAGTACTCACAGCTGTTGGCCTG ATATGCGCATTGGCTGGAGGGTTCGCCAAGGCAGATATAGAGAT GGCTGGGCCCATGGCCGCGGTCTGGTCTGCTAATTGTCAGTTACGT GGTCTCAGGAAAGAGTGTGGACATGTACATTGAAAGAGCAGGTG ACATCACATGGGAAAAAGATGCGGAAGTCACTGGAACAGTCCC CGGCTCGACGTGGCGCTAGATGAGAGTGGTGATTTCTCCCTGGTG GAGGATGACGGTCCCCCATGAGAGAGATCATACTCAAGGTGGT CCTGATGACCATCTGTGGCATGAACCCAATAGCCATACCCTTTGC AGCTGGAGCGTGGTACGTATACGTGAAGACTGGAAAAAGGAGTG GTGCTCTATGGGATGTGCCTGCTCCCAAGGAAGTAAAAAAGGGG GAGACCACAGATGGAGTGTACAGAGTAATGACTCGTAGACTGCT AGGCTCAACACAAGTTGGAGTGGGAGTTATGCAAGAGGGGGTCT TTCACACTATGTGGCACGTCAAAAAGGATCCGC</p> <p>Fragmento 2 (2297 bp, de nt 7991 a 10287, gen <i>ns5</i>)</p> <p>CCCGTGTTGGTGCAAAGCTATGGGTGGAACATAGTCCGTCTTAAG AGTGGGGTGGACGTCTTTCATATGGCGGCTGAGCCGTGTGACACG TTGCTGTGTGACATAGGTGAGTCATCATCTAGTCTGAAGTGGA GAAGCACGGACGCTCAGAGTCTCTCCATGGTGGGGGATTGGCTT</p>

		<p> GAAAAAAGACCAGGAGCCTTTTGTATAAAAGTGTTGTGCCCATAC ACCAGCACTATGATGGAAACCCTGGAGCGACTGCAGCGTAGGTAT GGGGGAGGACTGGTCAGAGTGCCACTCTCCCGCAACTCTACACAT GAGATGTACTGGGTCTCTGGAGCGAAAAGCAACACCATAAAAAAGT GTGTCCACCACGAGCCAGCTCCTCTTGGGGCGCATGGACGGGCCCT AGGAGGCCAGTGAAATATGAGGAGGATGTGAATCTCGGCTCTGGC ACGCGGGCTGTGGTAAGCTGCGCTGAAGCTCCCAACATGAAGATC ATTGGTAACCGCATTGAAAGGATCCGCAGTGAGCACGCGGAAACG TGGTTCTTTGACGAGAACCACCCATATAGGACATGGGCTTACCAT GGAAGCTATGAGGCCCCCACACAAGGGTCAGCGTCTCTCTAATA AACGGGGTTGTGAGGCTCCTGTCAAACCCTGGGATGTGGTGACT GGAGTCACAGGAATAGCCATGACCGACACCACACCGTATGGTCAG CAAAGAGTTTTCAAGGAAAAAGTGACACTAGGGTGCCAGACCCC CAAGAAGGCACTCGTCAGGTTATGAGCATGGTCTCTTCTGTTGT GGAAAGAGCTAGGCAAACACAAACGGCCACGAGTCTGTACCAA GAAGAGTTCATCAACAAGGTTCTGTAGCAATGCAGCATTAGGGGCA ATATTTGAAGAGGAAAAAGAGTGGAAGACTGCAGTGGAAGCTGT GAACGATCCAAGGTTCTGGGCTCTAGTGGACAAGGAAAGAGAGCA CCACCTGAGAGGAGAGTGCCAGAGTTGTGTGTACAACATGATGGG AAAAAGAGAAAAAGAAACAAGGGGAATTTGAAAGGCCAAGGGCA GCCGCGCCATCTGGTATATGTGGCTAGGGGCTAGATTTCTAGAGTT CGAAGCCCTTGGATTCTTGAACGAGGATCACTGGATGGGGAGAGA GAACTCAGGAGGTGGTGTGTTGAAGGGCTGGGATTACAAAGACTCGG ATATGTCCTAGAAGAGATGAGTCGCATACCAGGAGGAAGGATGTA TGCAGATGACACTGCTGGCTGGGACACCCGCATCAGCAGGTTTGA TCTGGAGAATGAAGCTCTAATCACCAACCAAATGGAGAAAGGGCA CAGGGCCTTGGCATTGGCCATAATCAAGTACACATACCAAAACAA AGTGGTAAAGGTCTTAGACCAGCTGAAAAAGGGAAAACAGTTAT GGACATTATTTGAGACAAGACCAAAGGGGGAGCGGACAAGTTGT CACTTACGCTCTTAACACATTTACCAACCTAGTGGTGCAACTCATT CGGAATATGGAGGCTGAGGAAGTTCTAGAGATGCAAGACTTGTGG CTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTGGTTGCAGAGCAAC GGATGGGATAGGCTCAAACGAATGGCAGTCAGTGGAGATGATTGC GTTGTGAAGCCAATTGATGATAGGTTTGCACATGCCCTCAGGTTCTT GAATGATATGGGAAAAGTTAGGAAGGACACACAAGAGTGGAACC CTCAACTGGATGGGACAACCTGGGAAGAAGTTCCGTTTTGCTCCAC CACTTCAACAAGCTCCATCTCAAGGACGGGAGGTCCATTGTGGTTC CCTGCCGCCACCAAGATGAACTGATTGGCCGGGCCCGCTCTCC AGGGGCGGGATGGAGCATCCGGGAGACTGCTTGCCTAGCAAAATC ATATGCGCAAATGTGGCAGCTCCTTTATTTCCACAGAAGGGACCTC CGACTGATGGCCAATGCCATTTGTTTCATCTGTGCCAGTTGACTGGGT TCCAACCTGGGAGAACTACCTGGTCAATCCATGGAAAGGGAGAATG GATGACCACTGAAGACATGCTTGTGGTGTGGAACAGAGTGTGGATT GAGGAGAACGACCACATGGAAGACAAGACCCAGTTGCGAAATGG ACAGACATTCCCTATTTGGGAAAAAGGGAAGACTTGTGGTGTGGAT CTCTCATAGGGCACAGACCGCGCACACCTGGGCTGAGAACATTAA AAACACAGTCAACATGGTGCGCAGGATCATAGGTGA </p>
VDEN-1	Hija (cabeza)	<p> Fragmento 1 (248 bp, gen c) CGGAAGCTTGCTTAACGTAGTTCTAACAGTTTTTTATTAGAGAGCAG ATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGGTGACCGTCTTTT AATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGT TGGCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCTTTGAGGCCAAGGACCCAT GAAATTGGTGATGGCTTTCATAGCATTCTAAGATTCTAGCCATAC CCCCAACAGCAGGAAT Fragmento 2 (187 bp, gen e) TTGACTGCTGGTGCAATGCCACAGACACATGGGTAACTATGGGAC </p>

		<p>GTGTTCTCAAACCGGCGAACACCGACGAGAGAAACGTTCCGTGGCA CTGGCCCCACACGTGGGACTTGGTCTAGAAACAAGAACCGAAACAT GGATGTCCTCTGAAGGCGCTTGGAAACAAATACAAAGAGTGGAAC TTGGGCTTTGAGACACCCAGGATTCACGGTGATAGCCTTGTTTTAG CAC</p> <p>Fragmento 3 (205 bp, gen e) GGGTAATGGCTGCGGACTATTCGGAAAAGGAAGTCTATTGACGTGT GCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAAGTAGAAGGAAAGATAGTTCAAT ATGAAAACCTAAAATATTCAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGGA CCAGCACCAGGTGGGAAACGAGACCACAGAACATGGAATAATTGCA ACCATAACACCTCAAGCTCCC</p>
	Hija (cabeza)	<p>Fragmento 1 (244 bp, gen c) AGCTTGCTTAACGTAGTTCTAACAGTTTTTTATTAGAGAGCAGATCTC TGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGGTCGACCGTCTTTCAATATG CTGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGA AGAGATTCTCAAAGGATTGCTTTTCAGGCCAAGGACCCATGAAATTG GTGATGGCTTTCATAGCATTCTAAGATTTCTAGCCATACCCCCAACA GCAGGAAT</p> <p>Fragmento 2 (233 bp, gen e) GTCGCCGAACGTTTGTAGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTGCGGACT ATTCGAAAAGGAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGA CAAACTAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAAATATTCAG TGATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGGTGGGAAACGA GACCACAGAACATGGAATAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCC</p>



Avales de la Tesis

AVALES DE LA TESIS

Artículos donde se presentan partes de los resultados de la tesis:

1. **Gutiérrez-Bugallo G**, Rodríguez-Roche R, Díaz G, Pérez M, Mendizábal ME, Peraza I, Vázquez A, Álvarez M, Rodríguez M, Bisset JA and Guzmán G. (2018) Spatio-temporal distribution of vertically transmitted dengue viruses by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Arroyo Naranjo, Havana, Cuba. **Tropical Medicine & International Health**. 23(12):1342-49.
2. **Gutiérrez-Bugallo G**, Boullis A, Martínez Y, Hery L, Rodríguez M, Bisset JA, Vega-Rua A. (2020) Vector competence of *Aedes aegypti* from Havana, Cuba, for dengue virus type 1, chikungunya, and Zika viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 14(12): e0008941.
3. Obadia T, **Gutierrez-Bugallo G**, Duong V, Nuñez AI, Fernandes RS, Kamgang B, Hery L, Gomard Y, Abbo SR, Jiolle D, Glavinic U, Dupont-Rouzeyrol M, Atyame CM, Pocquet N, Boyer S, Dauga C, Vazeille M, Yébakima A, White MT, Koenraadt CJM, Mavingui P, Vega-Rua A, *et al.* (2022) Zika vector competence data reveals risks of outbreaks: the contribution of the European ZIKAlliance project. **Nature Communications**. 13(1):4490.

Premios:

- **2017 Mención en Fórum Provincial de Ciencia y Técnica.** Transmisión vertical de los virus del dengue en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y su comportamiento espacio-temporal en el municipio Arroyo Naranjo (2013-2014).
- **2019 Premio En Jornada de Base e Institucional de las Brigadas Técnicas Juveniles.** Competencia vectorial de poblaciones cubanas de *Aedes aegypti* a los virus DENV-1, ZIKV y CHIKV”.
- **2019 Premio de la Academia de Ciencias de Cuba.** Transmisión vertical de los virus del dengue en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y su comportamiento espacio-temporal en el municipio Arroyo Naranjo durante 2013-2014.
- **2020 Resultados Relevantes Institucional.** Competencia vectorial de *Aedes aegypti* a los virus dengue-1, Zika y chikungunya en La Habana, Cuba.

- **2021 Premio Internacional L'Oréal -UNESCO «Para las mujeres y la Ciencia» Jóvenes Talentos Francia 2021.** Proyecto doctoral: Modos de transmisión de arbovirus en poblaciones cubanas de *Aedes aegypti*.

Eventos científicos:

- **2016, IV Simposio Internacional sobre Vigilancia, Monitoreo y Control de Vectores.** Trinidad, Cuba. Vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti*, Arroyo Naranjo, 2013-2014.
- **2017, XV Curso Internacional de Dengue.** La Habana, Cuba. Vertical transmission of dengue viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and its spatio-temporal variation in Arroyo Naranjo municipality (2013-2014).
- **2017, Congreso 80 Aniversario del IPK.** La Habana, Cuba. Transmisión vertical de los virus del dengue en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): su impacto en el control vectorial y la vigilancia virológica.
- **2018, VII Congreso de Higiene y Epidemiología (III Convención Internacional de Salud Pública “Cuba Salud 2018”).** La Habana, Cuba. Transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones cubanas de *Aedes aegypti*.
- **2019, Caribbean Science and Innovation Meeting.** Guadalupe, Francia. Intrinsic ability of Cuban *Aedes aegypti* populations to transmit dengue, chikungunya and Zika viruses.
- **2019, XVI Curso Internacional de Dengue (Simposio Vectores de arbovirus emergentes y su control).** La Habana, Cuba. Vector competence of Cuban populations of *Aedes aegypti* to dengue, Zika and chikungunya viruses.
- **2021, For Women in Science.** Paris, Francia. Transmission ways of arboviruses in Cuban *Aedes aegypti* populations.
- **2023, One Health International Symposium-GLACIER,** La Habana, Cuba. Vertical transmission of arboviruses by *Aedes aegypti*.

Tesis dirigidas y presentadas:

- **2023** – Dámaso Fernández Hernández (Cuba) (licenciada de Microbiología y Virología); Comportamiento espacio-temporal de la transmisión vertical del virus Zika en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en las áreas de salud Pasteur y Párraga durante 2018 y 2019; *Facultad de Biología, Universidad de La Habana*.
- **2019** - Flavia Álvarez Llorente (Cuba) (licenciada de Bioquímica y Biología Molecular); Comportamiento espacio-temporal de la transmisión vertical de los virus del dengue en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en las áreas de salud Pasteur y Párraga durante 2018; *Facultad de Biología, Universidad de La Habana*.
- **2017** – Gladys Gutiérrez Bugallo (Cuba) (Máster en Bioquímica, Mención Biología Molecular); Transmisión vertical de los virus del dengue en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y su comportamiento espacio-temporal en el municipio Arroyo Naranjo durante 2013-2014; Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

Artículos de la autora relacionados con el tema de estudio:

1. Gabiane G, Bohers C, Mousson L, Obadia T, Dinglasan RR, Vazeille M, Dauga C, Viglietta M, Yébakima A, Vega-Rúa A, **Gutiérrez-Bugallo G**, Gélvez Ramírez RM, Sonor F, Etienne M, Duclovel-Pame N, Bateau A, Smith-RavinJ, De Lamballerie X, Failloux AB. Evaluating vector competence for Yellow fever in the Caribbean. ***Nature Communications***. **15**, 1236 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45116-2>
2. **Gutiérrez-Bugallo G**, Piedra LA, Rodríguez M, Bisset JA, Lourenco-de-Oliveira R, Weaver SC, Vasilakis N, Vega-Rúa A. (2019) Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. ***Nature Ecology & Evolution***. 3(4):561-569.
3. **Gutiérrez-Bugallo G**, Rodríguez-Roche R, Díaz G, Vázquez A, Alvarez M, Rodríguez M, Bisset JA and Guzman G. (2017) First record of natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* from Cuba. ***Acta Tropica***; 174:146-148.