



Tesis en opción al grado científico de Máster en Virología

**Detección de los virus del dengue en estadios inmaduros de *Aedes*
(*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) de La Habana, 2019**

Autor: Lic. Armando Miguel Ruiz Esquivel

La Habana, 2022



Tesis para optar por el grado de Máster en Virología

**Detección de los virus del dengue en estadios inmaduros de
Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse, 1894) de La Habana, 2019**

Autor:

Lic. Armando Miguel Ruiz Esquivel

Tutores:

Lic. Mayling Álvarez Vera DrC.

Lic. Gladys Gutiérrez Bugallo MSc.

Asesores:

Dra. María Guadalupe Guzmán Tirado DrC.

Lic. Lisset Pérez Santos DrC.

La Habana, 2022

Índice

Introducción	1
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
1. Revisión Bibliográfica	4
1.1 La enfermedad del dengue	4
1.1.2 El dengue en Cuba.....	6
1.2 Los virus del dengue.....	6
1.2.1 Clasificación, estructura y organización del genoma	6
1.3 Origen geográfico de los DENV.	7
1.3.1 Serotipos, genotipos y linajes de los DENV	7
1.3.2 Diversidad genética de los DENV	9
1.4 Transmisión de los DENV	10
1.5 Biología de <i>Aedes albopictus</i>	11
1.5.1 Ciclo de vida y ecología de <i>Aedes albopictus</i>	11
1.5.2 <i>Aedes albopictus</i> como vector	13
1.6 La interacción de <i>Aedes albopictus</i> con los DENV.....	15
1.6.1 Ciclo extrínseco de los DENV en <i>Aedes albopictus</i>	15
1.6.2 La defensa del mosquito contra la infección por dengue	16
1.6.3 Selección viral por el mosquito	20
1.6.4 Vías de transmisión de los virus del dengue	21
2. Materiales y Métodos	23
2.1 Tipo de estudio.....	23
2.2 Descripción del área de estudio	23
2.3 Obtención y procesamiento de muestras entomológicas	24
2.3.1 Procesamiento de las muestras entomológicas.....	25
2.4 Detección y serotipificación de los virus del dengue	25
2.4.1 Extracción del ARN viral	25
2.4.2 Amplificación del gen C/PrM de los virus del dengue.....	25
2.4.3 Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa	26
2.4.4 Electroforesis en gel de agarosa	26
2.4.5 Segunda reacción de la PCR anidada: serotipificación de los virus del dengue.....	27
2.5 Genotipificación de los virus del dengue	28

2.5.1 Purificación del producto de la PCR anidada	28
2.5.2 Secuenciación nucleotídica de los fragmentos del gen CPrM de los virus del dengue .	29
2.5.2.1 Reacción de secuencia	29
2.5.2.2 Purificación del producto de la reacción de secuencia	29
2.5.2.3 Análisis de las secuencias	30
2.6 Construcción de mapas de distribución espacial de los virus del dengue	30
3. Resultados	31
3.1 Detección y serotipificación de los DENV	31
3.2 Distribución espacial de los DENV	32
3.3 Genotipificación de DENV	33
3.3.1 DENV-3	33
3.3.2 DENV-4	35
4. Discusión	37
4.1 Detección y serotipificación de los virus del dengue	37
4.2 Distribución espacial de los DENV	39
4.3 Genotipificación de los DENV	43
4.3.1 DENV-3	45
4.3.2 DENV-4	46
5. Conclusiones	48
6. Recomendaciones	49
7. Bibliografía	50
8. Anexos	67

Agradecimientos

La culminación de esta tesis es el logro de muchas personas, que de una forma u otra aportaron un granito de arena. Mi agradecimiento más sincero es a todos aquellos familiares, amigos y colegas que compartieron un pedacito de su cariño, tiempo y sabiduría para llegar a este punto de mi vida. Quiero que estas palabras sean cuando menos un elogio a todos ellos.

Quisiera mencionar a muchos profesores que influyeron en mi desarrollo como científico y profesional. Algunos me acompañan a diario, otros su pérdida se siente con mucho dolor. A Magdalena Rodríguez por siempre dedicarme su paciencia y su experiencia, siempre vas a estar en mi corazón, Ariamys Companioni, Maureen Leyva, Aileen González, el Dr. Bisset y María del Carmen Marquetti cuyos consejos fueron muy certeros para la escritura final de este documento. A mi querida Lisset Pérez que además de ser asesora en esta tesis le agradezco la paciencia que me dedica desde que nos conocemos y por siempre estar dispuesta a brindarme su ayuda incondicional y su consejo preciso. A Clarita Savón, por todo el interés que mostró en la conclusión de esta tesis. A la Dra. Guadalupe Guzmán, por brindarme su vasta experiencia y asesoramiento en cada momento, sus consejos siempre fueron muy útiles. A todos los profesores del departamento de Virología por sus clases magistrales. A todo el tribunal que evaluó esta tesis de la manera más profesional posible. A Gladys quien siempre ha puesto su experiencia, cariño, interés, paciencia y todo su conocimiento a disposición de mi superación profesional, gracias por tu tutela y tu amistad sincera. A Mayling por brindarme su tutela, su experiencia y su alegría. Sin estas personas esta tesis no fuese hoy posible.

Quiero agradecer a mis padres por haberme educado en el camino que ellos consideraron correcto y al fin y al cabo tener la razón. Por haberme dado valores universales y ser incansables en mi educación, aún lo hacen, y eso los hacen invaluable para mí. A toda mi familia por ser incondicionales. A mi esposa por brindarme su amor incondicional en todo momento y ser mi sostén en los días más grises, gracias por confiar en mí y regalarme tu sonrisa.

A ese grupo de amigos tan especial que me han acompañado en este viaje desde el comienzo, incluyendo una pandemia que azotó al mundo, de los cuales me siento muy orgulloso de haber contado con su apoyo: Celeste, Juan Carlos, Liss Claudia, Eric, Laura, Mairin, Gabriela, Israelito, Jorgito, Nell, Maria Karla, Dianelvys, Cinthia, María Fernanda, Rosmery, Luisito, Daylin, Dianeya y muchísimos más que no alcanzarían estas páginas para nombrarlos a todos, es un placer haber contado con su amistad, sus consejos y su alegría infinita.

Siempre se quedan muchos nombres fuera de estas líneas, sin embargo, todos forman parte de este logro. El conocimiento es un bien que crece cuando se comparte.

Resumen

El dengue es una enfermedad viral causada por cualquiera de los cuatro serotipos del complejo dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Esta enfermedad afecta a más de 120 países en varios continentes y se transmite al hombre por la picadura de mosquitos del género *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*), fenómeno conocido como transmisión horizontal. En Cuba no se ha demostrado la transmisión de dengue a humanos por *Aedes albopictus*. En condiciones naturales, la hembra del mosquito es capaz de transmitir los virus del dengue a su descendencia, fenómeno que se conoce como transmisión vertical. Se postula que este fenómeno puede representar una estrategia importante para el mantenimiento de los distintos serotipos en la naturaleza. La verificación de este fenómeno en Cuba es extremadamente importante y necesaria para un mejor entendimiento de la dinámica epidemiológica. Por esta razón el objetivo de este trabajo fue detectar la ocurrencia de transmisión vertical de los virus del dengue en estadios inmaduros de poblaciones de *Ae. albopictus* de La Habana durante el año 2019. Se realizaron colectas de larvas en los municipios de Arroyo Naranjo, Cotorro, Playa, Guanabacoa, Plaza de la Revolución y Boyeros, las que se analizaron mediante el empleo de técnicas moleculares para determinar la presencia de los virus del dengue. De los 90 grupos formados, 14 resultaron positivos para al menos un serotipo de dengue, 9 grupos del municipio Cotorro y 5 de Arroyo Naranjo, lo que demuestra la ocurrencia de la transmisión vertical en las poblaciones de *Ae. albopictus* de La Habana. Los serotipos de DENV-3 y DENV-4 mostraron una frecuencia de aparición de 6,7%, mientras que DENV-2 un 5,6%. Se obtuvieron 4 secuencias nucleotídicas, una se agrupó junto al genotipo III de DENV-3, mientras que las restantes tres secuencias se agruparon al genotipo I y II de DENV-4. La transmisión vertical implica, en última instancia, que un mosquito se alimentó de un humano virémico y fue capaz de replicar el virus para transmitirlo a su descendencia. Este hallazgo constituye una alerta a las autoridades de Salud Pública sobre el papel de esta especie en el mantenimiento de los serotipos de dengue en la naturaleza y la dinámica de transmisión de este arbovirus en Cuba.

Palabras clave: Transmisión vertical, *Ae. albopictus*, vigilancia virológica, Dengue, virus del dengue, genotipo, Cuba.

Abstract

Dengue is a viral disease caused by any of the four serotypes of the dengue complex (DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4). This disease affects more than 120 countries in several continents and is transmitted to humans by the bite of mosquitoes of the *Aedes* genus (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*), a phenomenon known as horizontal transmission. In Cuba, transmission of dengue to humans by *Aedes albopictus* has not been demonstrated. Under natural conditions, the female mosquito is capable of transmitting dengue viruses to her offspring, a phenomenon known as vertical transmission. It is postulated that this phenomenon may represent an important strategy for the maintenance of the different serotypes in nature. The verification of this phenomenon in Cuba is extremely important and necessary for a better understanding of the epidemiological dynamics. For this reason, the aim of this work was to detect the occurrence of vertical transmission of dengue viruses in immature stages of *Ae. albopictus* populations in Havana in 2019. Larval collections were made during this year in the municipalities of Arroyo Naranjo, Cotorro, Playa, Guanabacoa, Plaza de la Revolución and Boyeros, which were analysed using molecular techniques to determine the presence of dengue viruses. Of the 90 groups formed, 14 were positive for at least one dengue serotype, 9 groups from Cotorro municipality and 5 from Arroyo Naranjo, demonstrating the occurrence of vertical transmission in *Ae. albopictus* populations in Havana. DENV-3 and DENV-4 serotypes showed a frequency of occurrence of 6.7%, while DENV-2 showed a frequency of 5.6%. Four nucleotide sequences were obtained, one was grouped together with genotype III of DENV-3, while the remaining three sequences were grouped with genotype I and II of DENV-4. Vertical transmission ultimately implies that a mosquito fed on a viraemic human and was able to replicate the virus and transmit it to its offspring. This finding constitutes an alert to Public Health authorities about the role of this species in the maintenance of dengue serotypes in nature and the transmission dynamics of this arbovirus in Cuba.

Key words: Vertical transmission, *Ae. albopictus*, virological surveillance, Dengue, dengue virus, genotype, Cuba.

Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNsi	ARN de interferencia pequeño
C	Cápside
DENV	Virus del dengue
dN	Sustituciones no sinónimas
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato (de sus siglas en inglés)
dS	Sustituciones sinónimas
E	Envoltura
FD	Fiebre del dengue
Gln	Glicina
GS	Glándulas salivares
IPK	Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
K2 + G	Kimura de 2 parámetros con distribución Gamma
LB	Lámina basal

LNRA	Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus
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)
MINSAP	Ministerio de Salud Pública
MM	Marcador de peso molecular
MP	Membrana peritrófica
ONEI	Oficina Nacional de Estadística e Información
ORF	Marco abierto de lectura (de sus siglas en inglés)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés)
PIE	Periodo de incubación extrínseco
PrM	Pre-membrana
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN (de sus siglas en inglés)
RT	Transcripción reversa (de sus siglas en inglés)
SEB	Barrera al Escape de las Glándulas Salivales (de sus siglas en inglés)
SIB	Barrera a la Infección de las Glándulas Salivales (de sus siglas en inglés)
UTR	Regiones no traducibles (de sus siglas en inglés)

Introducción

Los vectores de mayor importancia en la transmisión de los virus dengue (DENV) lo constituyen *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus 1762), originario probablemente del África subsahariana a partir de una especie ancestral salvaje y zoofílica nombrada *Aedes aegypti formosus* (1) y *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) nativo del sudeste asiático, las Islas del Océano Índico y el Pacífico Occidental donde se le conoce como “el tigre asiático” (2). *Aedes albopictus* es el vector principal en la transmisión de dengue en Japón en ausencia de *Ae. aegypti*, y se le considera el responsable de un brote de dengue en la Metrópolis de Japón en el año 2014 (3,4).

En los últimos 50 años la incidencia de fiebre por dengue en las poblaciones humanas experimentó un incremento dramático, con una expansión a más de 100 países. Se estima que ocurre un promedio de 100 a 400 millones de nuevos casos anuales por algún serotipo de dengue. Es imposible separar la explosión epidemiológica del dengue en los últimos años y la distribución geográfica del vector, condicionada esta por el cambio climático, que puede empeorar en gran medida a pesar de los esfuerzos gubernamentales por detener su avance (5).

En las Américas la presencia de *Ae. albopictus* se informó por primera vez en 1985 en el Estado de Texas, Estados Unidos. Se postula que su introducción ocurrió a través del comercio de gomas de autos usados (6). A partir de aquí se observó una amplia y acelerada distribución por todo el continente (7, 8). Las actuales condiciones climáticas que incluyen el rango de temperaturas donde puede sobrevivir *Ae. albopictus* es un factor esencial en los modelos predictivos de la distribución de este vector. Dichos modelos predicen la colonización de territorios como el norte de los Estados Unidos y el sur de Canadá en pocos años (9, 10). En Europa *Ae. albopictus* fue detectado por primera vez en Albania en 1979 y posteriormente en Italia en 1990 (11). En la actualidad se encuentra establecido en más de 20 países y se le considera el responsable de brotes de dengue y Chikungunya en Croacia, Francia e Italia (11). Los modelos de dispersión

predicen la futura expansión sustancial de esta especie hacia las zonas del norte y el este de Europa en los próximos años, se espera que alrededor del 83% de las áreas urbanas sean aptas para sostener a esta especie (12).

Aedes albopictus es un mosquito con una marcada plasticidad ecológica (13), a la que se le atribuye su acelerada expansión global, fuertes aptitudes competitivas, comportamiento en la alimentación, competencia vectorial y sobre todo su habilidad para entrar en diapausa para escapar de las condiciones ambientales desfavorables para su desarrollo (14, 15).

En Cuba la presencia de *Ae. albopictus* se informó por primera vez en 1995 en el municipio de La Lisa, ubicado en la provincia de La Habana (16). En la actualidad, este mosquito se encuentra distribuido en todas las provincias del país (17). El papel que juega esta especie en la transmisión de dengue en Cuba aún es incierto, debido a que todas las investigaciones realizadas hasta el momento se centran en el papel de *Ae. aegypti* como vector principal.

En la literatura se informó la transmisión vertical de los DENV en *Ae. albopictus* en varios países como Brasil (18), Colombia (19), México (20), Filipinas (21) y Tailandia (22). Varios autores concuerdan en la factibilidad de la vigilancia molecular de los arbovirus en general en estadios inmaduros de mosquitos del género *Aedes* (18, 23). La colecta de mosquitos en estadios inmaduros de desarrollo (larvas y pupas) conlleva mucho menos riesgos que la captura de adultos. Debido a que el monitoreo de estas especies puede brindarnos información de los arbovirus que puedan circular en la naturaleza, se propone la introducción y sistematización de estos procedimientos como una fuente complementaria de información para los sistemas de vigilancia virológica.

Teniendo en cuenta las investigaciones precedentes sobre la transmisión vertical de los DENV en *Ae. aegypti* (24) y un informe previo sobre *Ae. albopictus* (25) en Cuba y su posible implicación en el mantenimiento de la circulación viral en la naturaleza, es de mucha utilidad actualizar las investigaciones en una especie no menos importante y el papel que pudiera desempeñar en las epidemias de dengue en Cuba.

Objetivo General

Determinar la ocurrencia de transmisión vertical y el comportamiento espacial de los virus del dengue en estadios inmaduros de poblaciones de *Aedes albopictus* en La Habana en 2019.

Objetivos Específicos

1. Identificar los serotipos de los virus del dengue encontrados en estadios inmaduros de *Ae. albopictus*.
2. Analizar la distribución espacial de los virus del dengue en poblaciones inmaduras de *Ae. albopictus* de La Habana.
3. Determinar los genotipos de los virus encontrados.

1. Revisión Bibliográfica

1.1 La enfermedad del dengue

El dengue es una de las enfermedades tropicales más comunes que afectan a los humanos causada por la picadura de un mosquito del género *Aedes* (26). En las décadas recientes el dengue es un problema de salud pública internacional. La incidencia del dengue se multiplicó 30 veces en los últimos 50 años y se estima que más de la mitad de la población mundial vive en zonas de riesgo de contraer la enfermedad (27). La infección por cualquiera de los serotipos de dengue puede producir diferentes formas clínicas que van desde una forma asintomática a una sintomática. Esta última inicia con un estado febril agudo inespecífico (fiebre indiferenciada), la cual clínicamente es indistinguible de otras infecciones virales. La fase febril persiste generalmente de 2 a 7 días, los pacientes desarrollan fiebre alta repentina, acompañada o no con exantema, malestar general, mialgias, artralgias, dolor de cabeza, de garganta, retro-orbital, anorexia, náuseas y vómitos (28).

La anterior clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los estados de la enfermedad del dengue, se componía de tres categorías de enfermedad: fiebre no diferenciada (DF) y dengue hemorrágico (FHD) (29). La FHD se clasificó a su vez en cuatro grados de gravedad, con los grados III y IV definidos como Síndrome de Choque por dengue (SCD). La utilidad de esta clasificación fue cuestionada por considerarla rígida y demasiado dependiente de resultados de laboratorio y no inclusiva de enfermos de dengue con otras formas de gravedad, tales como la afectación particular del sistema nervioso central (SNC) (encefalitis), del corazón (miocarditis) o del hígado (hepatitis grave). En 2009 se introdujo una clasificación revisada de la OMS que sustituyó las clasificaciones anteriores por dengue/dengue grave (30). Sin embargo, por razones prácticas fue conveniente dividir el gran grupo de pacientes con dengue no-grave en dos subgrupos: pacientes con signos de alarma y aquellos sin éstos; teniendo muy en cuenta que los pacientes con dengue sin signos de alarma pueden desarrollar dengue grave (31).

La infección por un serotipo desarrolla inmunidad tipo-específica a largo plazo en los convalecientes, y la progresión a formas graves de la enfermedad es frecuentemente asociada con una infección secundaria por algún serotipo heterólogo (32). Otras hipótesis sostienen cambios en la virulencia del virus, susceptibilidad genética, la tormenta de citosinas y la respuesta inmunológica del hospedero (33).

La incidencia exacta del dengue es difícil de determinar, pero las estimaciones del número real de infecciones anuales por dengue oscilan entre 284 y 528 millones, de los cuales 96 millones son casos aparentes (34). Los casos aparentes se definen como todas las infecciones sintomáticas, incluidas las que no son detectadas por los sistemas de notificación. En los informes de casos de dengue en 76 países se observó un aumento sustancial en la incidencia del dengue entre 1990 y 2013. El número de casos aparentes se duplicó en cada década, de 8,3 millones en 1990 a 58,4 millones en 2013. Entre los casos ocurridos en 2013, 10,5 millones se trataron en un entorno hospitalario, 28,1 millones de casos se trataron en un entorno sanitario ambulatorio, y 19,7 millones permanecieron fuera del sistema sanitario. Las mayores tasas de incidencia estandarizadas por edad se dieron en el Sudeste Asiático, con una media anual de 34,3 casos por 1000 personas (34, 35).

Las infecciones inaparentes por DENV son un componente importante en los brotes globales de dengue porque pueden servir como una fuente de infección al mosquito. Tiempo atrás se asumía que las personas con infecciones inaparentes no eran capaces de infectar mosquitos porque no alcanzaban niveles suficientemente altos de viremia (36). Sin embargo, Duong *et al.* demostraron que las personas con infecciones naturales por los DENV y sin síntomas clínicos pueden contribuir a la dinámica de transmisión a través de la eficiente infección de mosquitos *Ae. aegypti*. Independientemente de los mecanismos subyacentes, esos resultados confirman la hipótesis de que la transmisión de los DENV de humanos a mosquitos puede ser "silente" ya que ocurre en ausencia de enfermedad aparente (37).

1.1.2 El dengue en Cuba

Desde el siglo XVIII y hasta mediados del siglo XX (1945) en Cuba existieron informes de brotes que bien podrían atribuirse a la enfermedad del dengue (38). Sin embargo, no es hasta 1977 que por primera vez se confirma a nivel de laboratorio la ocurrencia de una epidemia causada por DENV. El agente etiológico aislado en esta epidemia fue DENV-1, se estima que se infectó el 50% de la población con un cuadro benigno (39). Posteriormente, en 1981 se produce otra epidemia esta vez el agente causante fue DENV-2, que concluyó con 158 fallecidos, de ellos 101 niños (40). Luego de esta epidemia, 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. En 1997 se produjo una nueva epidemia, esta vez el agente etiológico fue DENV-2, localizada fundamentalmente en la provincia de Santiago de Cuba, con 3012 casos confirmados y 12 fallecidos (41). En el año 2000, se informó la circulación del DENV-3 (42). Posteriormente, en 2006 ocurrió un incremento de la transmisión. Se detectaron casos de dengue en 8 provincias del país (Camagüey, Ciego de Ávila, Cienfuegos, La Habana (antes de la división en Artemisa/Mayabeque), Guantánamo, Villa Clara, Las Tunas y la Ciudad de La Habana, donde se aislaron los serotipos 3 y 4 (43). A pesar de los esfuerzos para controlar la transmisión del dengue en Cuba, durante las últimas décadas se informó la circulación de varios serotipos en el país (43).

1.2 Los virus del dengue

1.2.1 Clasificación, estructura y organización del genoma

Los virus del dengue (DENV) pertenecen al género *Flavivirus* de la Familia *Flaviviridae*, poseen un ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 10,7 kb de longitud rodeado de una nucleocápside de simetría icosaédrica, de 30 nm de diámetro, la cual está constituida por una proteína C (cápside) de ~11 Kd. Esta estructura se encuentra contenida por una bicapa lipídica de 10 nm de grosor; en la que se encuentran insertadas las proteínas estructurales E (envoltura) y M (membrana) de ~53 kd y ~26 Kd respectivamente, dando lugar a proyecciones que sobresalen de la superficie de los viriones. El genoma posee un único marco abierto de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*), que se encuentra flanqueado por regiones no traducibles (UTR, del

inglés *Untranslation Regions*) que van desde aproximadamente 100 nucleótidos en el extremo 5'UTR hasta aproximadamente 400-700 nucleótidos en el extremo 3'UTR. El ARN de las partículas virales maduras codifican para una poliproteína que es escindida en tres proteínas estructurales (C, M y E) y siete no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (44).

1.3 Origen geográfico de los DENV.

Existe una fuerte evidencia que sugiere que los DENV se originaron en primates no humanos (DENV selvático) en África y Asia. Se estima que los DENV selváticos emergieron hace unos mil años, sin embargo la transmisión entre humanos quedó establecida hace tan solo unos cientos de años (45, 46). Malasia se considera una zona donde todos los serotipos del dengue evolucionaron de forma independiente a partir de un linaje ancestral silvestre (45). La primera cepa de DENV-1, la cepa Mochizuki, fue aislada en 1943 en Japón, y en 1977 y 1984 se informaron casos en las Américas y África respectivamente (47). El DENV-2 se calcula que divergió de su ancestro selvático hace aproximadamente unos 400-600 años (45). Este serotipo se notificó por primera vez en 1944 en Asia (Papúa, Nueva Guinea e Indonesia), en 1964 en África (Nigeria) y en 1953 en América (República de Trinidad y Tobago) (47). El DENV-3 se notificó por primera vez en 1953 en Asia (Filipinas y Tailandia), en 1963 en América (Puerto Rico) y durante 1984-1985 en África (Mozambique) (47). El DENV-4 se notificó por primera vez en Asia (en Filipinas y Tailandia) en 1953 y en las Américas (Brasil, Cuba, Dominica, Puerto Rico y las Islas Vírgenes de EE.UU.) en 1981 (47).

1.3.1 Serotipos, genotipos y linajes de los DENV

El DENV puede clasificarse en cuatro serotipos distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) que comparten aproximadamente un 65% de similitud en la secuencia de aminoácidos. Cada serotipo incluye varios genotipos. Un genotipo se define como un grupo de aislados de DENV que no tienen más de un 6% de divergencia en su secuencia de nucleótidos en una región dada del genoma (46). Cada uno de estos serotipos se dividen a su vez en varios genotipos o clados, como también suelen definirse (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los genotipos de los DENV y su distribución geográfica. Fuente (27, 48, 49)

Serotipo	Genotipo	Origen geográfico
DENV-1	I	Sudeste de Asia, China y el este de África.
	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.
DENV-2	Asiático 1	Malasia y Tailandia.
	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.
	Selvático	Aislamientos colectados en humanos, mosquitos selváticos o monos centinelas tanto en el Sudeste Asiático como en África Occidental.
DENV-3	I	Malasia, Filipinas, Indonesia y de las Islas del Pacífico Sur.
	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. En la India 2013.
	V	Puerto Rico de los años 60 y 70, así como un aislamiento de Tahití de 1965.
DENV-4	I	Tailandia, Filipinas, Japón y Sri Lanka.
	II	Indonesia, Malasia, Tahití, Las Américas y el Caribe.
	III	Aislamientos recientes de Tailandia.
	IV	Aislamientos selváticos colectados en Malasia.

1.3.2 Diversidad genética de los DENV

Cada serotipo contiene un número determinado de genotipos, que generalmente se asocian con diferentes regiones geográficas (tabla 1). Esta diversidad genética de los DENV, al igual que otros virus ARN, se atribuye a la baja fidelidad de su ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, del inglés RNA-depending RNA-polimerase, codificada por NS5), la cual opera en ausencia de actividad correctora de errores e introduce una mutación por cada ciclo de replicación viral (50). Esto provoca la acumulación de genomas virales genéticamente distintos, organizados alrededor de una secuencia consenso en cada hospedero. Se postula que estas variantes intrahospedero, llamadas también cuasi especies, 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 (51). La baja fidelidad de la RdRp y rápida velocidad de replicación, otorgan a los arbovirus en general la capacidad de adaptarse rápidamente a los ambientes fluctuantes que le impone la alternancia de hospederos. No obstante, los análisis basados en el estudio de presiones selectivas por sitio, a través del cálculo de la tasa de sustituciones no sinónimas sobre las sinónimas (dN/dS), sugieren que la mayoría de las mutaciones de los DENV son deletéreas ($dN/dS \ll 1$) y que están sujetas a una fuerte presión purificadora (52).

Los estudios epidemiológicos moleculares pueden identificar el recambio (extinción y/o reemplazo) de genotipos y linajes de DENV. En una determinada región geográfica, un genotipo o linaje en particular podría surgir y persistir durante varios años y luego extinguirse y ser reemplazado por un genotipo o linaje completamente nuevo. El cambio de linaje puede darse por un proceso estocástico o surgir debido a variaciones en la aptitud de los DENV (53).

La introducción de nuevos grupos de virus a poblaciones con "ingenuidad" serológica tiene el potencial para causar brotes sin precedentes y se asoció con manifestaciones más graves de dengue (27). Por ejemplo, la introducción del genotipo asiático/americano de DENV-2 en el Caribe en 1981 se asoció con tasas más elevadas de las formas graves de la enfermedad (54). La sustitución del genotipo asiático/americano del DENV-2 por el genotipo asiático 1 del DENV-2 en Vietnam se atribuyó a niveles más

elevados de viremia en los pacientes (55). Un estudio en Perú encontró que el linaje II del genotipo asiático/americano del DENV-2 se asoció con un brote grave de dengue en 2010 y 2011. Este linaje fue genéticamente diferente del linaje I del genotipo asiático/americano del DENV-2 que circuló previamente en ese país (32). En India, la introducción de un nuevo linaje de DENV-2 Cosmopolita también se asoció con un aumento de las manifestaciones graves del dengue (56). El Linaje I del genotipo asiático de DENV-2 se asoció con una mayor tasa de replicación de DENV en humanos y mosquitos comparadas con el genotipo asiático/americano del DENV-2. Esto puede asociarse con una mayor transmisión tanto en humanos como en vectores, lo que puede conducir a brotes en regiones donde este linaje es dominante (56).

1.4 Transmisión de los DENV

En la literatura se informan dos ciclos de transmisión de los virus del dengue bien definidos: ciclo de transmisión urbana (ciclos de transmisión en las ciudades donde están presente los seres humanos) y ciclo de transmisión selvático (áreas forestales). Ambos ciclos difieren ecológica y evolutivamente. Los ciclos urbanos ocurren en 128 países donde los principales vectores son *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (27). La transmisión vertical (del mosquito hembra a su descendencia) es esencial en el mantenimiento de ambos ciclos urbano y selvático, especialmente mientras transcurre la estación de seca o los períodos interepidémicos (57). Hasta el momento no se reconocen otras rutas de transmisión que no incluyan directamente al vector como pudiesen ser: transfusión de sangre, trasplante de órganos, transmisión perinatal, tampoco existe evidencia que pueda transmitirse por vía del semen como confirmaron estudios con el virus del Zika (58, 59).

Los virus del dengue mantienen un ciclo replicativo natural exitoso al transmitirse a humanos por mosquitos del género *Aedes*, por lo que se considera un arbovirus (del acrónimo, arthropod-borne, transmitidos por artrópodos). Hasta la fecha se conocen cuatro serotipos (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4) que, a pesar de ser genéticamente distintos, causan enfermedades similares e incluso comparten características epidemiológicas (60, 61). La infección por un serotipo puede causar inmunidad a mediano plazo, sin embargo, la infección por otro serotipo es un factor de riesgo para desarrollar las formas graves de la enfermedad (62, 63).

1.5 Biología de *Aedes albopictus*

Aedes albopictus (Skuse, 1894) es una especie invasora originaria del este de Asia. En el transcurso de las últimas cuatro décadas colonizó exitosamente los continentes de América, Europa y África (64). Se postula que su acelerada distribución se favorece por el comercio internacional, especialmente de neumáticos usados (65). La presencia de *Ae. albopictus* se registró por primera vez en Cuba en el municipio La Lisa, ubicado en la provincia La Habana en 1995 (16) y para 2018 se informó su distribución en los 15 municipios de La Habana (17, 66).

1.5.1 Ciclo de vida y ecología de *Aedes albopictus*

El ciclo de vida de *Ae. albopictus* consta de dos etapas bien definidas. La primera la constituye una fase acuática o inmadura representada por tres formas evolutivas diferentes: huevo, larva y pupa; y la segunda, por la fase aérea o adulta (figura 1).

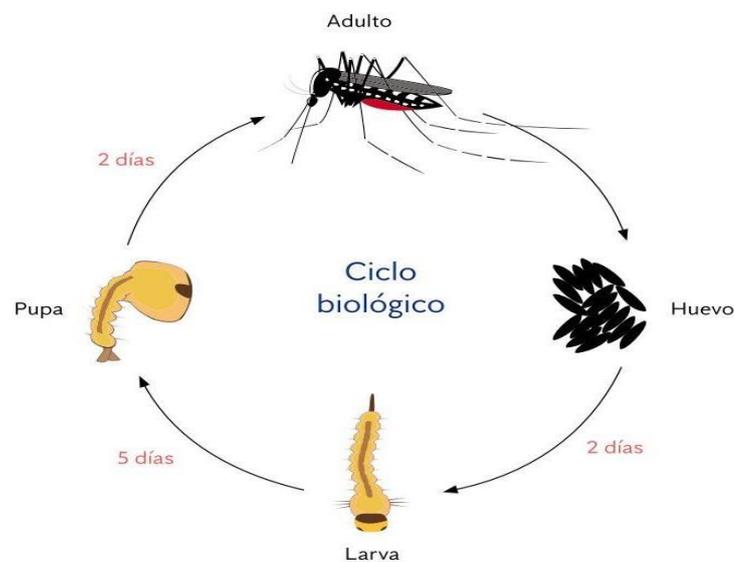


Figura 1. Ciclo de vida de *Ae. albopictus*.

Una característica importante, que confiere una ventaja evolutiva a esta especie, es su capacidad para entrar en diapausa. La diapausa es una vía de desarrollo alternativa que se caracteriza por el desarrollo y la reestructuración metabólica. Incluye la regulación coordinada de procesos oxidativos que producen energía, la supresión de procesos que

consumen energía y la regulación de procesos que mejoran la resistencia al estrés (14). Los huevos de *Ae. albopictus* pueden permanecer durante varios meses, hasta un año, a la espera de condiciones favorables para eclosionar y continuar con el ciclo biológico.

El mosquito adulto se caracteriza por presentar una coloración negra con escamas blancas en las patas, tórax y abdomen y una línea conspicua blanca longitudinal central entre tórax y cabeza. Tiene una longitud de entre unos 5 y 10 milímetros (13). La temperatura óptima para el desarrollo del mosquito es de 25°C y pueden llegar a vivir entre 20-30 días, a temperaturas de 15°C pueden llegar hasta los 50 días. Varios estudios comprueban la capacidad de supervivencia de *Ae. albopictus* a las temperaturas invernales (67). La alimentación deficiente en los estadios larvales también dilata el tiempo necesario para el desarrollo del insecto, y se encuentra estrechamente relacionada con una disminución en el tamaño final del adulto (13).

Se plantea que *Ae. albopictus* no se aleja grandes distancia de sus criaderos. Varias investigaciones concluyen que el radio del vector se encuentra entre los 250 metros diarios, pero puede alcanzar distancias de hasta 500 metros en condiciones que lo requieran (68, 69). En contraste, otros autores sugieren que el rango de vuelo es mucho más amplio y que pueden llegar a volar distancias superiores a los 750 m a lo largo de su vida (70).

Las hembras poseen un aparato bucal picador-chupador adaptado a la hematofagia sobre vertebrados (71). 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.

Aedes albopictus se considera principalmente zoofílico y capaz de alimentarse de la mayoría de los grupos de vertebrados de sangre fría y caliente, incluidos reptiles, aves y anfibios (13). Estudios realizados sobre fuentes de ingesta en hembras capturadas en el exterior de las viviendas en Estados Unidos, Tailandia, Italia, La Reunión y Camerún reveló que *Ae. albopictus* se alimentó preferentemente de humanos en lugar de animales domésticos (el 95% de las ingestas de sangre contenían sangre humana) (72-75).

El ciclo gonadotrófico presenta una duración aproximada de 72 horas, aunque puede distenderse a temperaturas bajas (76). Después de una alimentación sanguínea completa, la hembra puede volver a alimentarse en un intervalo de dos a cuatro días (76, 77). Las hembras adultas pueden producir hasta cinco lotes de huevos durante su vida y los ponen en cantidades entre 100-200 por ovipuesta, lo que depende de la cantidad de sangre ingerida.

Aedes albopictus informa una fuerte plasticidad ecológica, lo que permite su rápida adaptación a una amplia gama de hábitats. Los estudios en África central muestran que sus sitios de reproducción larval son diversos, que van desde sitios naturales (agujeros de árboles, conchas de caracoles, agujeros de roca, cáscaras de cacao y coco) hasta contenedores artificiales (contenedores de almacenamiento de agua, neumáticos usados, latas, restos de automóviles, macetas) (78).

De cada huevo nace una larva (figura 1) que inicia un ciclo de cuatro estadios, con un incremento desde de 1,0 mm de largo y 0,01 mg de peso hasta alcanzar 7,0 mm y 5,0 mg en su último estadio. Las larvas permanecen la mayor parte del tiempo en la superficie, ya que necesitan respirar, pero se alimentan debajo del agua de materia orgánica como algas y otros microorganismos. Su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25-29°C, entre cinco a siete días. Después de la etapa larval, este mosquito transita hacia el estadio pupal en el que se mueve constantemente, pero no se alimenta y dura aproximadamente dos días. El ciclo de *Ae. albopictus*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación entre nueve a diez días (13).

1.5.2 *Aedes albopictus* como vector

La habilidad de una especie para transmitir un patógeno, bajo condiciones espacio-temporales dadas, se conoce como capacidad vectorial (79) y se encuentra determinada tanto por factores extrínsecos o ecológicos, como por otros intrínsecos. Entre los primeros, se encuentran la longevidad, el período de incubación extrínseco y la abundancia del vector [56]. Por su parte, los factores intrínsecos se relacionan con las

bases genéticas de la especie vectora, que incluyen la susceptibilidad a la infección, la permisividad para el desarrollo del patógeno y la eficiencia en la transmisión, y que se definen en su conjunto como competencia vectorial (80). La capacidad vectorial entonces, comprende tanto la interacción del vector con el patógeno, como con el hospedero; mientras que la competencia vectorial se encuentra restringida exclusivamente a la interacción vector-patógeno y depende igualmente de ambos (81).

Aedes albopictus es el responsable de la transmisión de dengue en gran parte de la región de Europa y Asia solo superado por *Ae. aegypti*, y es casi exclusivamente el vector de las grandes epidemias en zonas periurbanas de esta enfermedad en Europa y Asia (82). Como se describió anteriormente, su comportamiento se vincula al hombre en la medida que se estrecha más el contacto entre ambos. Su acelerada tasa de preferencia por la alimentación antropofágica y algunos rasgos de su conducta se identifican como potenciadores de la transmisión de los arbovirus (83).

Este vector es capaz de transmitir al menos 22 arbovirus, entre los que se encuentran el dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya (CHIKV), la fiebre del Valle del Rift, la encefalitis japonesa, el virus del Nilo Occidental y el virus Sindbis. Además, varios estudios demuestran que *Ae. albopictus* también tiene la capacidad de transmitir en condiciones de laboratorio otros arbovirus, como el virus del Rio Ross, la encefalitis equina occidental, Oropouche, Jamestown Canyon, San Angelo y el virus Trivittatus (84). Los estudios de competencia vectorial infieren que *Ae. albopictus* es un vector muy eficiente de CHIKV y es capaz de transmitir el virus a los pocos días de ingerir la sangre infectada (85). Curiosamente, se observó que un cambio de aminoacídico en el gen de la envoltura 1 (E1), en la posición 226 (A226V), era responsable del aumento de la adaptabilidad y la mejora de la transmisión de CHIKV por *Ae. albopictus* en comparación con *Ae. aegypti* (86). Los estudios también demuestran que *Ae. albopictus*, cuando se coinfecta con DENV y CHIKV, es capaz de replicar y diseminar ambos virus de forma independiente (87).

1.6 La interacción de *Aedes albopictus* con los DENV

1.6.1 Ciclo extrínseco de los DENV en *Aedes albopictus*

Una vez que el virus ingresa en el mosquito, por medio de la sangre humana ingerida, se inicia un periodo de incubación extrínseco (PIE) que finaliza cuando las partículas virales son excretadas en la saliva. El PIE puede durar entre 2 y 15 días en dependencia de las condiciones climáticas, los genotipos del virus y el mosquito, las condiciones de desarrollo del estadio larval de la hembra y la dosis viral adquirida (88-90).

La interacción del virus con su vector es un fenómeno clave en la transmisión de los DENV, pues para que esta sea efectiva, deben ocurrir determinados eventos que permitan al virus completar su ciclo dentro del vector (91). Cronológicamente, después de que el virus es ingerido por el mosquito, llega hasta las células epiteliales del intestino medio donde se replica. Posteriormente, la progenie viral es liberada, alcanza el 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 en la saliva a un nuevo hospedero durante la picadura (figura2)(92).

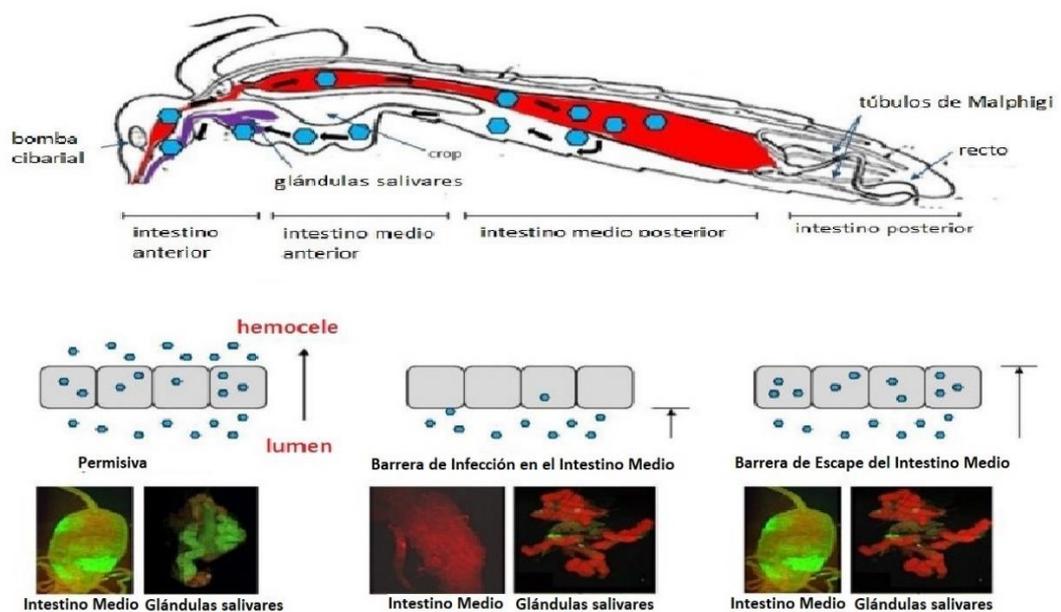


Figura 2. Se muestra la ruta que siguen las partículas virales en la hembra del mosquito. Adaptada de (93, 94).

El ciclo de vida de los DENV en las células del mosquito es generalmente homólogo al de las células humanas (95). Inicialmente, el virus se une a los receptores de superficie de las células epiteliales del intestino medio (96). A continuación ocurre la endocitosis mediada por clatrina y la subsecuente maduración endosómica, que implica una disminución del pH lo cual promueve la fusión de la envoltura viral con el endosoma, y así la liberación del ARN viral al citoplasma para su replicación y traducción (97, 98). La traducción del ARN viral ocurre en el retículo endoplasmático produciendo un único polipéptido que es luego procesado en las proteínas individuales tanto estructurales como no estructurales. La replicación del ARN viral ocurre a través de la producción de una cadena intermediaria negativa que sirve como molde para la síntesis de múltiples copias de ARN viral positivo. Las proteínas estructurales C, prM y E son luego producidas en grandes cantidades mediante sucesivos ciclos de traducción y ensamblaje con el ARN viral en el retículo endoplasmático (99). Este proceso continúa con la maduración de los viriones en el Complejo de Golgi, la eventual exocitosis viral de la célula huésped y la diseminación e infección a otras células (100). La unión de los arbovirus a la célula huésped es cepa/especie específica. Pequeños cambios en la secuencia aminoacídica de los receptores puede alterar la especificidad del hospedero (93).

1.6.2 La defensa del mosquito contra la infección por dengue

1.6.2.1 Barreras a la infección por dengue

Como todos los insectos, *Ae. albopictus* posee múltiples barreras anatómicas y fisiológicas, que pueden impedir la invasión y establecimiento de patógenos durante los procesos de infección. La primera barrera física que ofrece el vector es la membrana peritrófica (MP), una gruesa envoltura quitinosa semipermeable compuesta además por proteínas y glicoproteínas, que rodea el alimento contenido en el lumen y lo separa del epitelio intestinal (101). La MP de la hembra se forma 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 (102). Algunos autores plantean que la MP es impermeable a partículas del tamaño de virus (103), 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 (102). La degradación de la membrana peritrófica o de la capa de mucina unida a la membrana favorece la permisividad de los insectos a los arbovirus en los mosquitos (94).

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 (79). 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 (93).

Una vez dentro del epitelio intestinal, el virus debe replicarse y alcanzar el sistema circulatorio del mosquito con el fin 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) (79).

Las evidencias disponibles sugieren que la lámina basal (LB) es la ruta crítica en la MEB (104). Esta estructura que separa las células del intestino medio del hemocele es una matriz proteica secretada por las células epiteliales en su superficie basolateral (105). Entre los mecanismos de diseminación viral propuestos está 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 (106). También se postula que determinadas moléculas señales y efectoras, que se activan en presencia de la replicación viral, remodelan la LB de manera que los viriones puedan atravesarla (107).

Después de una diseminación exitosa desde el intestino medio, los arbovirus normalmente infectan los hemocitos, el cuerpo graso, el tejido neural y en ocasiones el tejido muscular antes de infectar las glándulas salivares (GS) (93, 108). La replicación del DENV en ellas está también controlada por dos barreras naturales: la Barrera a la Infección de las Glándulas Salivales (SIB, del inglés Salivary gland Infection Barrier) y la Barrera al Escape de las Glándulas Salivales (SEB, del inglés Salivary gland Escape Barrier).

Similar a la infección del intestino medio se cree que la invasión de la GS esté mediada por receptores (93). Para *Ae. aegypti* se postula que en los eventos de reconocimiento de los cuatro serotipos de DENV participen como receptores las proteínas de 77, 58, 54 y 37 kDa de las GS (109). Posteriormente, la liberación del virus en la saliva se supone ocurra dependiente de apoptosis. Datos experimentales sugieren que una apoptosis inducida a corto plazo es necesaria para que el virus sea eficientemente liberado en los conductos salivares, después de romper las células acinares de las GS (110); aunque existen evidencias de una fuerte presión de selección contra la apoptosis inducida constitutivamente en células de mosquitos infectadas por arbovirus (111).

También existen determinantes virales que permiten burlar las barreras que vectorial virus. Se ha comprobado que la composición de la envoltura viral juega un papel fundamental en el cruce de estas barreras tisulares (112). Por ejemplo, Khoo *et al.* (113) describieron que con solo la sustitución de un aminoácido cargado Arg94 por Gln en la glicoproteína E de DENV-2, el virus experimentó un escape eficiente del intestino medio cuando se enfrentó a una fuerte MEB en *Ae. aegypti* y por tanto un aumento de la competencia vectorial en el culícido. De manera similar, en Sri Lanka una cepa nativa de DENV-3 fue desplazada por una cepa invasora. Ambas fueron asociadas con una tasa similar de infección en *Ae. aegypti*, pero la cepa invasora de DENV-3 poseía una ventaja replicativa que indujo una acelerada diseminación de la infección (114)

1.6.2.1 Respuesta inmunológica innata a la infección por dengue

Además de las barreras naturales existen mecanismos inmunológicos innatos que limitan la infección viral en el vector (92). La vía Toll es conservada en mosquitos y juega un papel decisivo en la defensa antiviral (99). La infección por DENV en el intestino medio, el cuerpo y las glándulas salivares activa la transcripción de los componentes y efectores de esta vía, por lo que múltiples péptidos antimicrobianos como cecropina y defensina son secretados para combatir el virus (115). Las infecciones con las cepas PR DENV-1 provocaron una respuesta más fuerte de los genes de la vía inmunitaria Toll que el PR DENV-2 en *Ae. aegypti*, pero en *Ae. albopictus* la expresión de los genes de la vía Toll tendió a ser similar entre los serotipos. Dos genes (un gen de la proteína ribosómica

S5 y un gen similar a la nimrod) de *Ae. albopictus* se expresaron en respuesta al DENV (116). El papel de reconocimiento molecular para una amplia mayoría de arbovirus por la vía IMD (del inglés immunodeficiency) en cultivos celulares Aeg2 se comprobó recientemente (117). El papel antiviral de la vía JAK-STAT (del inglés Janus kinase/signal transducers and activator soft transcription) es conservado en la defensa contra DENV. La replicación del DENV en el intestino medio del mosquito es significativamente incrementada cuando esta vía es transitoriamente suprimida (118).

La vía ARN de interferencia (ARNi) es la mayor respuesta innata antiviral que los vectores usan para restringir las infecciones por arbovirus (119). 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) (119). 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 (Dicer-2, R2D2, RISC, Ago2) (99, 120). Los genes de la vía ARNsi experimentan una selección rápida, positiva y diversificadora en mosquitos (121), y su diversidad se asocia con la competencia vectorial de esta especie (122, 123). Se destaca además la importancia de la vía RNAi en la modelación de la estructura poblacional del arbovirus para lo cual se postula 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 (119).

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 su infección a los niveles necesarios para su transmisión eficaz (92, 119).

1.6.3 Selección viral por el mosquito

El cambio de hospederos somete a los arbovirus a frecuentes y significativas disminuciones del tamaño poblacional. Dentro de ambos hospederos, estas caídas ocurren durante el establecimiento inicial de la infección y la sucesiva dispersión hacia los tejidos y órganos. Durante el proceso de alimentación sanguínea del mosquito, un pequeño porcentaje de la población total de virus circulante en el humano establece una infección en el insecto (124). El arbovirus infecta los principales tejidos del mosquito desde su establecimiento en el intestino medio, la difusión hacia el hemocele y la invasión de las GS, en función de ser transmitido, y de esta manera encuentra varios obstáculos anatómicos (92). Aunque estos obstáculos producen caídas severas en el tamaño de la población viral, no afectan el grado de diversidad genética, la cual es rápidamente restablecida por mutaciones y la expansión demográfica consiguiente (92). Sin embargo, el repertorio de variantes virales es significativamente alterado durante estos procesos, tal como lo demostraron Sim *et al.* (124). En este estudio la diversidad genética de DENV se mantuvo durante la transmisión del humano al mosquito, pero el repertorio de variantes cambió sustancialmente entre la sangre venosa y los diferentes órganos de *Ae. aegypti* que se infectaron al alimentarse de una persona enferma. Más del 90% de las variantes genéticas de DENV presentes en la sangre venosa ingerida se perdieron en la transición al abdomen del mosquito, así como desde el abdomen hasta las GS. Por otro lado, Lequime *et al.* (125) estudiaron el comportamiento de las poblaciones virales de dengue en diferentes líneas de mosquitos *Ae. albopictus*. Estos investigadores hallaron que la diversidad genética de DENV se incrementó significativamente después de la infección inicial, pero fue restringida por una fuerte selección purificadora durante la expansión de la población de DENV en el intestino medio. Los niveles de diversidad genética de DENV que se observaron en el intestino medio difirieron significativamente entre las líneas de mosquitos evaluadas. De esta manera concluyeron que la diversidad genética de DENV está determinada por el genotipo del vector y los efectos combinatorios de la deriva genética y la selección natural.

1.6.4 Vías de transmisión de los virus del dengue

La transmisión de patógenos entre hospederos se clasifica como vertical u horizontal independientemente de la vía física de transmisión (126). La transmisión vertical o hereditaria, se refiere a la transmisión de patógenos de un parental a la descendencia, mientras que la transmisión horizontal incluye todos los otros modos de transmisión no parental, incluyendo la transmisión por vectores. La transmisión vertical y horizontal no son mutuamente excluyentes y la combinación de ambas, conocida como transmisión de modo mixto, es común entre hospederos y patógenos, ya sean eucariotas, bacterias o virus (127).

Los virus del dengue se mantienen en la naturaleza principalmente mediante la transmisión entre la hembra de un vector del género *Aedes* y el hombre (transmisión horizontal). El mosquito se infecta al alimentarse con sangre de un humano virémico y, después de completar el período de incubación extrínseco, el virus puede infectar a un humano susceptible durante la próxima alimentación del mosquito infeccioso (89). Aunque la transmisión horizontal es fundamental en la determinación de la epidemiología de esta enfermedad, existen hipótesis sobre vías alternativas de transmisión en las poblaciones del vector (128).

El mantenimiento de los arbovirus en áreas endémicas durante condiciones desfavorables para la actividad vectorial es una evidencia epidemiológica que hace sospechar de rutas alternativas de transmisión (129). Se postulan varias teorías para explicar el mantenimiento de los arbovirus durante períodos interepidémicos, tales como la reintroducción del virus, la circulación en otras especies que actúan como reservorios y mecanismos alternativos de transmisión (129). Estudios filogeográficos de secuencias de aislamientos virales en humanos, colectados antes, durante y después de epidemias de DENV, encontraron que a pesar del grado de mutación del virus, la entidad viral fue la misma a lo largo del tiempo en cada lugar, aunque difirió entre los distintos sitios estudiados (130, 131). Esto sugiere que el virus se mantuvo localmente a pesar de la ausencia de condiciones para la transmisión horizontal (129).

La transmisión vertical de los DENV en poblaciones del género *Aedes* se propone como un mecanismo que garantiza el mantenimiento del virus en la naturaleza durante condiciones adversas para la transmisión horizontal (128). Se observó que las hembras de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son capaces de transmitir el virus verticalmente a su descendencia, después de infectarse, ya sea mediante alimentación o inoculación intratorácica en condiciones de laboratorio (83). Este fenómeno se encuentra descrito también en la naturaleza por estudios que comprueban la presencia los DENV en larvas y machos adultos colectados en el terreno (83). Varios autores sugieren que la transmisión vertical de los virus del dengue favorece la circulación endémica de estos virus (132, 133), lo cual pudiera explicar que los países con mayor cantidad de reportes de transmisión vertical de dengue en mosquitos se ubican en zonas consideradas endémicas o hiperendémicas como Latinoamérica (134, 135) y el Sudeste asiático (136, 137).

La transmisión vertical 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 oviposición (138). No obstante, algunos autores han declarado que la transmisión vertical no ocurre en determinadas poblaciones de mosquitos o que en algunos contextos ocurre con baja frecuencia (139-141). Hasta el momento, las consecuencias epidemiológicas de la transmisión vertical de los DENV en mosquitos generan controversia (128). De cualquier manera, la posibilidad de que una hembra del género *Aedes* infectada por transmisión vertical pueda ser infecciosa inmediatamente después de emerger, sin tener que ponerse en contacto previo con un humano virémico, multiplica el riesgo de transmisión de este virus (142). Además, se propone que la detección de la transmisión vertical de los DENV en la naturaleza, pudiera ser de utilidad en los sistemas de vigilancia y alerta temprana de brotes de dengue.

En la actualidad no existen vacunas disponibles ni tratamientos terapéuticos específicos para hacer frente al dengue. La medida profiláctica fundamental se basa en estrategias integradas de disminución de las poblaciones del género *Aedes* para detener su transmisión (143). De esta manera, cada vez son más urgentes las investigaciones encaminadas a profundizar en el conocimiento de la transmisión de los DENV y mejorar los sistemas de vigilancia que faciliten el monitoreo de la situación epidemiológica y permitan dar una respuesta para controlar la transmisión.

2. Materiales y Métodos

2.1 Tipo de estudio

Este es un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con carácter retrospectivo.

2.2 Descripción del área de estudio

El estudio se realizó en 6 municipios de la provincia de La Habana (Arroyo Naranjo, Boyeros, Cotorro, Guanabacoa, Playa y Plaza de la Revolución) (figura 3) la que se ubica en la región occidental de Cuba, entre 22°58', 23°10' de latitud norte y los 82°30', 82°06' de longitud oeste. Ocupa el decimocuarto lugar en extensión geográfica entre las provincias con 721,01 km², y representa el 0,7% de la superficie total del país. Sus límites geográficos son: al norte con el Estrecho de la Florida, al oeste con la provincia de Artemisa, al este y sur con la Provincia de Mayabeque. Es la provincia más pequeña del país y la más poblada, con alrededor del 20 % de la población (2.135.498 habitantes). Estos municipios se eligieron teniendo en cuenta el historial de elevados valores de infestación de *Ae. albopictus* (144) y el número de casos de dengue que se informan anualmente.

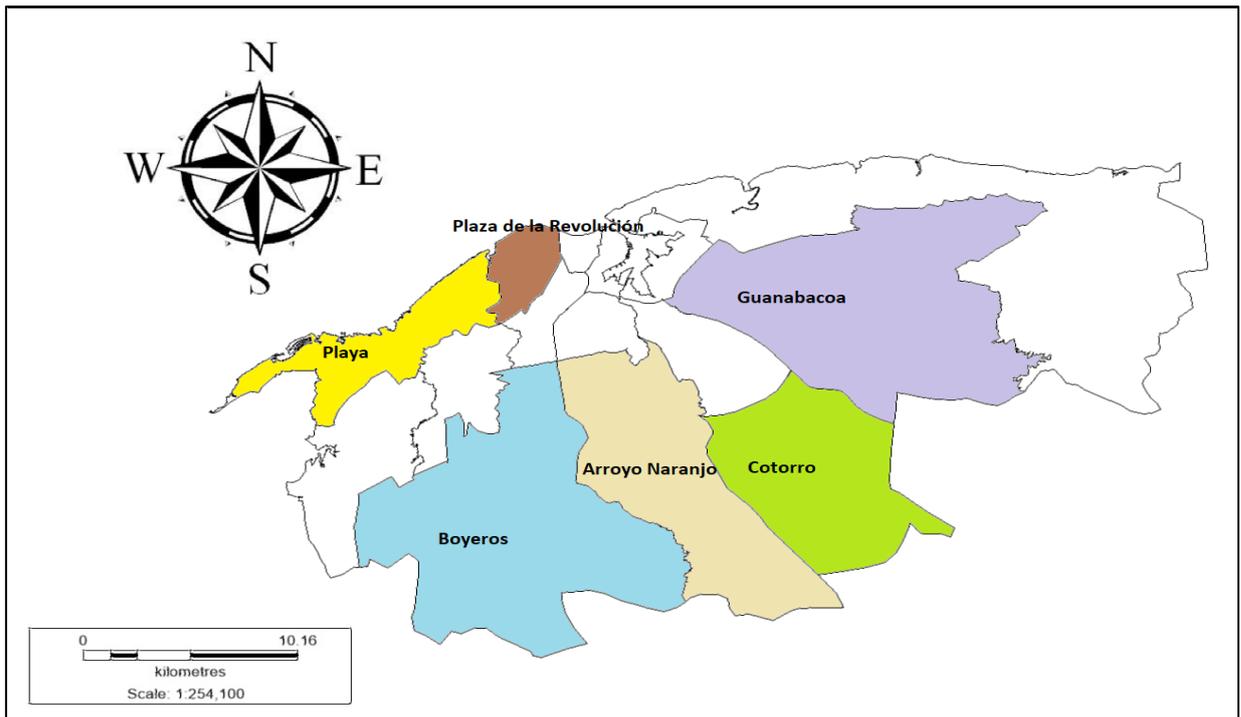


Figura 3. División política-administrativa de la provincia La Habana. En colores se muestran delimitados los municipios que se utilizaron en el estudio. Tomado de Oficina Nacional de Estadística e Información (ONEI), 2022.

2.3 Obtención y procesamiento de muestras entomológicas

Las larvas y pupas se colectaron durante el año 2019 por los operarios del Programa de Control de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* del Ministerio de Salud Pública en las áreas de salud y fueron enviadas al Departamento de Vigilancia y Lucha Antivectorial de cada municipio. Las muestras identificadas como *Ae. albopictus* se conservaron en etanol al 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 reclasificadas como *Ae. albopictus* se contaron y se enviaron al Departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), donde fueron clasificadas nuevamente y 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 y los sitios de colecta fueron georeferenciados con el programa MapInfo v.11.0 (Pitney Bowes Software Inc, 2011) en concordancia con los datos de cada sitio de colecta.

2.3.1 Procesamiento de las muestras entomológicas

Con las muestras colectadas se conformaron grupos mixtos (larvas y pupas) de entre 15 y 25 ejemplares. En cada grupo formado se tuvo en cuenta la distancia del área en que fueron colectadas, nunca se incluyó en el mismo grupo, larvas o pupas colectadas a una distancia superior a 2 manzanas adyacentes. Los grupos se maceraron con PBS al 1% en un disruptor de tejidos TyssueLyser II (Qiagen, Alemania) y centrifugados a 13000xg por 15 min a 4°C, el sobrenadante se conservó a -80°C para su posterior procesamiento.

2.4 Detección y serotipificación de los virus del dengue

2.4.1 Extracción del ARN viral

La extracción del ARN de los DENV 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.

2.4.2 Amplificación del gen C/PrM de los virus del dengue

El 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, según el protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (145) con las siguientes modificaciones: 1. empleo de enzimas de mayor fidelidad OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Alemania) y Expand High Fidelity PCR System (Roche, Alemania), 2. adición de inhibidor de ARNasa a la primera reacción de la PCR anidada y 3. aumento de las temperaturas de hibridación de los cebadores en ambas reacciones, en la primera ronda de reacción de 55 a 65°C y en la segunda ronda de reacción de 55 a 63°C. Estas modificaciones tuvieron como objetivo aumentar la sensibilidad del procedimiento diseñado originalmente para el diagnóstico de los DENV en muestras de suero humano.

2.4.3 Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa

La primera reacción de la PCR anidada consistió en una Transcripción Reversa (RT, por sus siglas en inglés) en un solo paso. Se utilizó el estuche comercial OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Alemania) y el termociclador QCyler II (Quanta Biotech, Reino Unido) para la reacción de amplificación según la recomendación del fabricante. Se preparó, para cada muestra, una mezcla que contenía tampón de reacción (1X), solución equimolar de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTP, por sus siglas en inglés) (400 $\mu\text{mol/L}$ cada uno), 1 $\mu\text{mol/L}$ de los cebadores D1 (sentido: 5'-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG-3') y D2 (antisentido: 5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-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 previamente 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 5 min.

2.4.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la presencia del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de 511 pares de bases (pb) producto de la primera reacción de la PCR anidada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 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 GelRed 10000X (Nucleic Acid Stain) para la visualización de las bandas. Se aplicaron, en cada pocillo, 10 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. Las tallas de cada amplicón se estimaron a partir de un marcador molecular de ADN (Promega™ 100bp DNA Ladder Molecular Weight Marker) que se incluyó en cada gel como referencia.

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

La segunda reacción de la PCR anidada se realizó a partir del ADNc obtenido en la RT-PCR, los cebadores descritos por Lanciotti *et al.* (145) (tabla 2) 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 dNTP (200 $\mu\text{mol/L}$ de cada uno), la enzima polimerasa (1,5 U), agua libre de nucleasas y 1 $\mu\text{mol/L}$ de los cebadores D1 (sentido) y TS1, TS2, TS3 y TS4 (antisentido) hasta completar 48 μL . Los cuatro cebadores antisentido se agregan a la mezcla e hibridan con la cadena de ADNc en dependencia del serotipo de DENV que se amplifique (tabla 2). Posteriormente, se adicionaron 2 μL del producto de amplificación de la primera reacción de la PCR anidada para un volumen final de 50 μL de mezcla. Se utilizaron, como controles negativo y positivo, tubos a los que se añadieron respectivamente, en lugar de ADNc molde, 2 μL del producto de reacción correspondiente a dichos controles en la RT-PCR.

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificar el gen C/PrM y serotipificar los virus del dengue, adaptada de (152).

Cebador	secuencia (5'→3')	Especificidad de tipo	Producto (pb)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	DENV	511 (D1 and D2)
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	DENV	
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	DENV-1	482 (D1 and TS1)
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	DENV-2	119 (D1 and TS2)
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	DENV-3	290 (D1 and TS3)
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	DENV-4	392 (D1 and TS4)

La reacción se ejecutó en un termociclador QCyler II (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.

Para evidenciar la presencia del producto obtenido en la PCR anidada, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Como control positivo se utilizó un grupo formado por aislamientos virales de los cuatro serotipos de dengue suministrado por el LNRA del IPK. Además, se utilizó un marcador de peso molecular de ADN (100 bp DNA *Ladder Molecular Weight Marker*, Promega).

2.5 Genotipificación de los virus del dengue

2.5.1 Purificación del producto de la PCR anidada

Los productos de la PCR anidada se purificaron mediante el empleo del estuche comercial Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Alemania) como sigue: se añadieron 5 volúmenes de tampón PB por cada volumen de producto de la PCR anidada. Esta mezcla se aplicó en una columna de purificación (suministrada por el fabricante) y se centrifugó a 15000xg por 1 min a 4°C. Se descartó el eluato, se añadieron 750 µL de tampón PE y se centrifugó dos veces más en igualdad de condiciones. El contenido de la columna se eluyó en un tubo limpio después de añadir 50 µL de tampón EB, se dejó reposar por 1 min y se centrifugó a igual velocidad, temperatura y tiempo que en los pasos anteriores. La verificación de la efectividad del proceso se efectuó a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% del ADN purificado.

2.5.2 Secuenciación nucleotídica de los fragmentos del gen CPrM de los virus del dengue

2.5.2.1 Reacción de secuencia

La determinación de la secuencia nucleotídica de los productos de la PCR anidada se realizó mediante el método de Sanger (146) 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, dNTP, dideoxinucleótidos marcados y tampón de reacción) y un cebador (0,25 $\mu\text{mol/L}$) 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 según la talla aparente del amplicón (ver tabla 2 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 QCyler II (Quanta Biotech, Reino Unido).

2.5.2.2 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. Para ello, se preparó un tubo estéril etiquetado para cada muestra, al cual se le adicionaron 5 μL de solución terminadora (2 μL de Acetato de Sodio 3 mol/L + 2 μL EDTA 100 mmol/L + 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 2 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.

2.5.2.3 Análisis de las secuencias

Los productos purificados de la reacción de secuencia se transfirieron a las placas del secuenciador automático de electroforesis capilar CEQ 8800 (Beckman Coulter, EE. UU). Las secuencias y sus cromatogramas correspondientes se procesaron en el programa Sequencer 4.9 (Gene Codes Corporation, EE. UU).

Las secuencias que se obtuvieron del segmento C/PrM del genoma viral de los DENV provenientes de los estadios inmaduros de los grupos de larvas analizados se compararon con secuencias similares obtenidas en otros estudios y que se encuentran disponibles en la base de datos GenBank (Anexos). Las secuencias descargadas junto con las obtenidas en esta investigación fueron alineadas mediante el algoritmo ClustalX (147) y se realizó una prueba de ajuste de modelo evolutivo en MEGA 11 (148).

2.6 Construcción de mapas de distribución espacial de los virus del dengue

Los sitios de aparición de estadios inmaduros de *Ae. albopictus* infectados con algún serotipo de dengue fueron cartografiados a partir de los datos de georreferenciación obtenidos para cada muestra mediante el Sistema de Información Geográfica MapInfo v.11.0 (Pitney Bowes Software Inc, 2011) Se construyeron mapas de distribución en los municipios donde se encontraron grupos positivos para algún serotipo de DENV por medio del programa MapInfo v.11.0 (Pitney Bowes Software Inc, 2011).

3. Resultados

3.1 Detección y serotipificación de los DENV

Se colectó un total de 2052 especímenes de *Ae. albopictus* en estadios inmaduros (larvas y pupas) entre enero y diciembre de 2019. El municipio donde se obtuvo la mayor cantidad de muestras, organizados de mayor a menor, fue el Cotorro donde se capturaron 1051 especímenes, 363 de Arroyo Naranjo, 299 de Plaza de la Revolución, 205 de Boyeros, 89 de Playa y 45 de Guanabacoa (Tabla 3). Se conformaron un total de 90 grupos de los cuales 14 resultaron ser positivos para al menos un serotipo de DENV, lo cual representa un 15,6% de positividad durante el periodo de estudio.

La electroforesis en gel de agarosa al 2% de la RT-PCR no reveló ningún producto. Sin embargo, los productos de la PCR anidada a partir de la primera reacción revelaron los amplicones específicos para cada serotipo de DENV (figura 4). Este resultado permitió confirmar la presencia de los virus en estadios inmaduros de *Ae. albopictus* y la determinación del serotipo viral en cada caso.

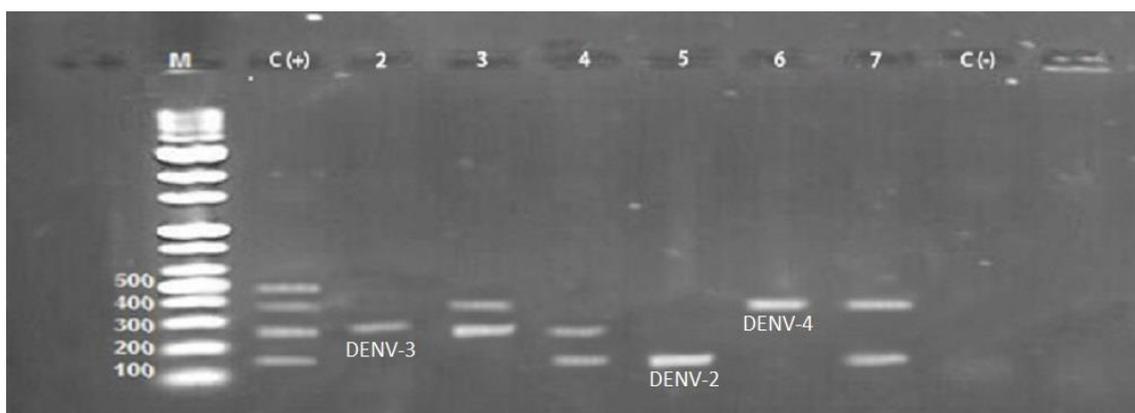


Figura 4. Gel de agarosa al 2% de la segunda reacción "nested" de PCR en grupos positivos a dengue de estadios inmaduros de *Ae. albopictus*. M: Marcador de peso molecular. C(+): control positivo de los cuatro serotipos de dengue, DENV-1 (482 pb), DENV-3 (290 pb), DENV-4 (392 pb), DENV-2 (119 pb). Los carriles del 2 al 7: grupos positivos de dengue obtenidos en este estudio, C(-): control negativo.

De los 6 municipios donde se realizó el estudio, solamente en dos se observaron grupos positivos para algún serotipo de DENV: Arroyo Naranjo y Cotorro. En ambos municipios se detectaron tres serotipos: DENV-2, DENV-3 y DENV-4. Los serotipos DENV-3 y DENV-4 aparecieron con mayor frecuencia en los grupos que se formaron (6,7%), para DENV-2 se observó una positividad de 5,6%. En cuatro de los grupos se detectaron simultáneamente varios serotipos: DENV-2/3 (1 grupo), DENV-2/4 (2 grupos) y DENV-3/4 (1 grupo) (tabla 3).

Tabla 2. Total de *Aedes albopictus* colectados y grupos positivos a los serotipos de dengue durante enero a diciembre de 2019 en seis municipios de La Habana.

Municipio	Especímenes colectados	Grupos formados	Grupos positivos	Serotipos					
				DENV2	DENV3	DENV4	DENV2/3	DENV2/4	DENV3/4
Cotorro	1051	47	9	2	2	3	1	1	0
A. Naranjo	363	16	5	0	2	1	0	1	1
P. de La Rev.	299	12	0	0	0	0	0	0	0
Boyeros	205	9	0	0	0	0	0	0	0
Playa	89	4	0	0	0	0	0	0	0
Guanabacoa	45	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	2052	90	14	2	4	4	1	2	1

3.2 Distribución espacial de los DENV

La distribución espacial de los serotipos de dengue identificados puede observarse en la figura 5. En el municipio Arroyo Naranjo se detectaron grupos de estadios inmaduros infectados en las áreas de salud de Grimau (2 grupos), Mantilla (2 grupos) y Párraga (1 grupo), mientras que en Cotorro fue en Efraín Mayor donde se detectó la mayor cantidad de grupos positivos (8 grupos) de todo el estudio y Cuatro Caminos (1 grupo).

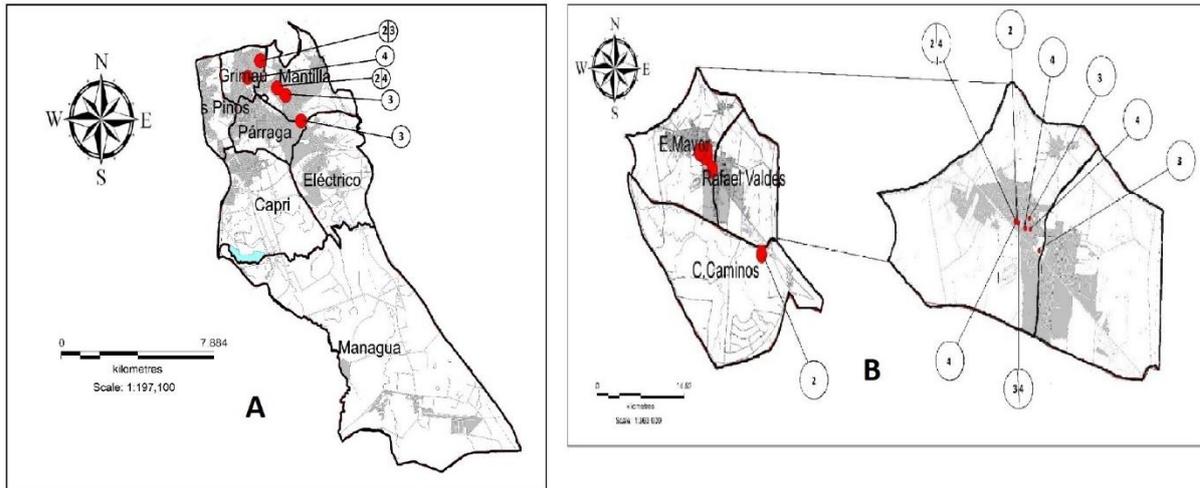


Figura 5. Distribución espacial de los DENV detectados en grupos de estadios inmaduros de *Aedes albopictus* en 2019 en el municipio Arroyo Naranjo (A) y Cotorro (B). Los puntos rojos representan las áreas donde se detectaron grupos positivos. Los valores englobados en los círculos muestran los serotipos identificados.

3.3 Genotipificación de DENV

En los casos en los que se observó en un mismo grupo la presencia de varios serotipos, se extrajeron y purificaron los amplicones. Sin embargo, este método genera pérdidas durante la purificación a partir del gel de agarosa (149) y no se logró obtener ARN viral de calidad suficiente para su posterior secuenciación. De esta manera, de los 14 grupos donde la PCR fue positiva se obtuvieron 4 secuencias: tres de DENV-4 y una de DENV-3. Del serotipo 2 no fue posible obtener ninguna secuencia con calidad adecuada para su análisis.

3.3.1 DENV-3

Con la secuencia de DENV-3 obtenida en este estudio (C26 D3/CUB/2019) se realizó un análisis filogenético que incluyó 47 secuencias descargadas de la base de datos del GenBank. El alineamiento se efectuó con 233 nucleótidos y el modelo más fiable para el análisis evolutivo fue el de Kimura 2-parámetros con una distribución Gamma (K2+G) (figura 6). La secuencia del estudio se agrupó junto con otras secuencias del genotipo III aisladas entre 2001 y 2010 en la región de las Américas, específicamente Nicaragua, Perú y Cuba.

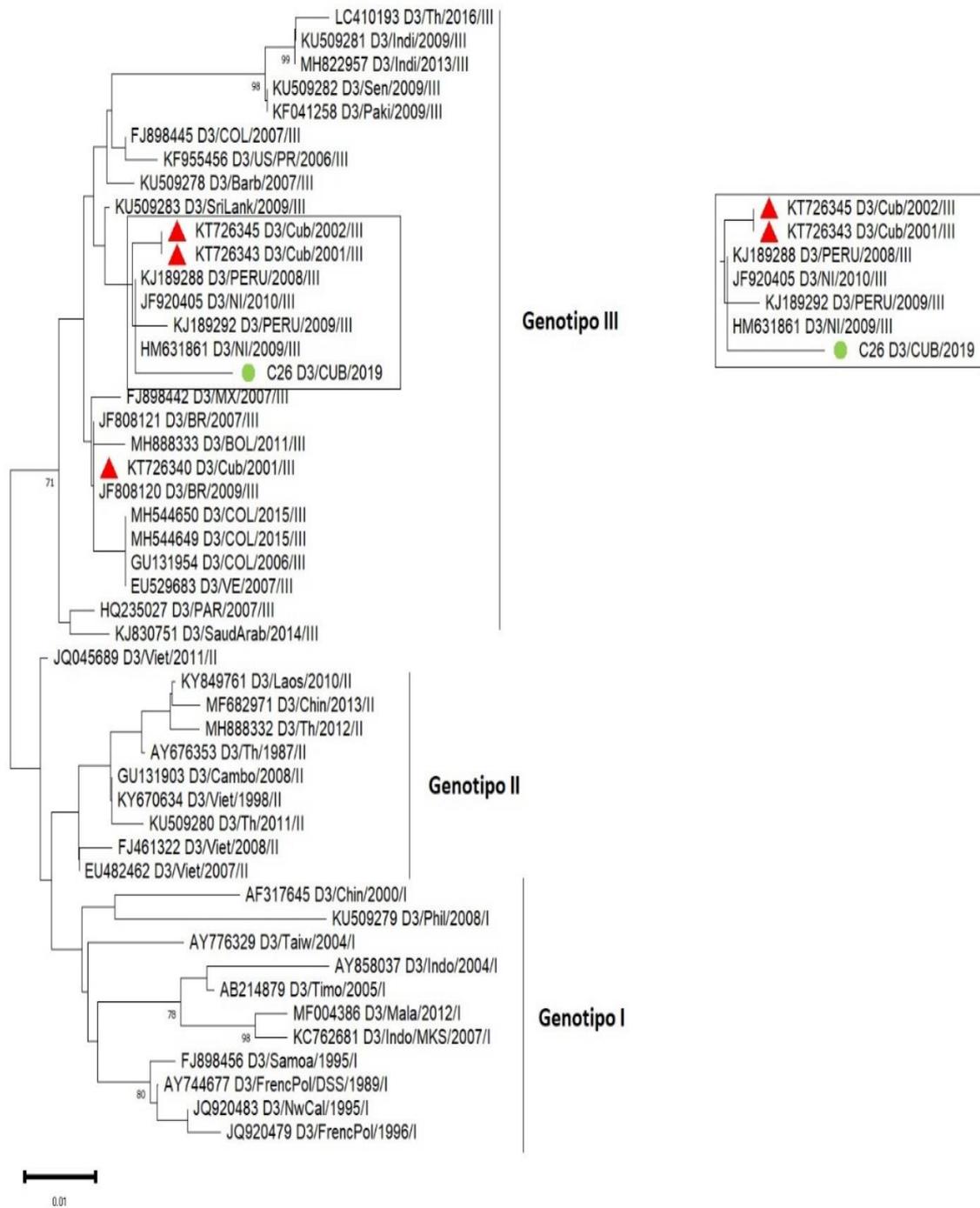


Figura 6. Árbol filogenético construido a partir del método de Neighbor-Joining con 48 secuencias de DENV-3 basado en el gen C/PrM (233 pb) utilizando datos brutos alojados en el repositorio público Genbank. Este árbol incluye una nueva secuencia agrupada dentro del genotipo II, se indica con un círculo en verde. Las posiciones de otras secuencias de Cuba se indican con un triángulo. Las longitudes de las ramas horizontales son proporcionales a la barra que representa la probabilidad de coalescencia. Las cepas de DENV se nombran de la siguiente manera: Número de acceso al GenBank/serotipo/país/año/genotipo. Se muestran los valores de soporte estadístico (bootstrap) superiores al 70% en los nodos.

3.3.2 DENV-4

Se obtuvieron 3 secuencias de DENV-4 (C22 D4/CUB/2019, C19 D4/CUB/2022 y C1 D4/CUB/2022) y se realizó un análisis filogenético con 51 secuencias almacenadas en el Genbank. El alineamiento de las secuencias se realizó con 311 nucleótidos y el modelo que mejor describió la evolución de las secuencias fue el de Kimura 2-parámetros con una distribución Gamma (K2+G) (figura 7). Las secuencias del estudio C22 D4/CUB/2019 y C19 D4/CUB/2022 se agruparon con otras del genotipo II que circularon en Costa Rica y que en última instancia compartieron un ancestro común con otras secuencias que circularon en Venezuela y Brasil, mientras que C1 D4/CUB/2022 se agrupó con otras secuencias del genotipo I obtenidas en Brasil.

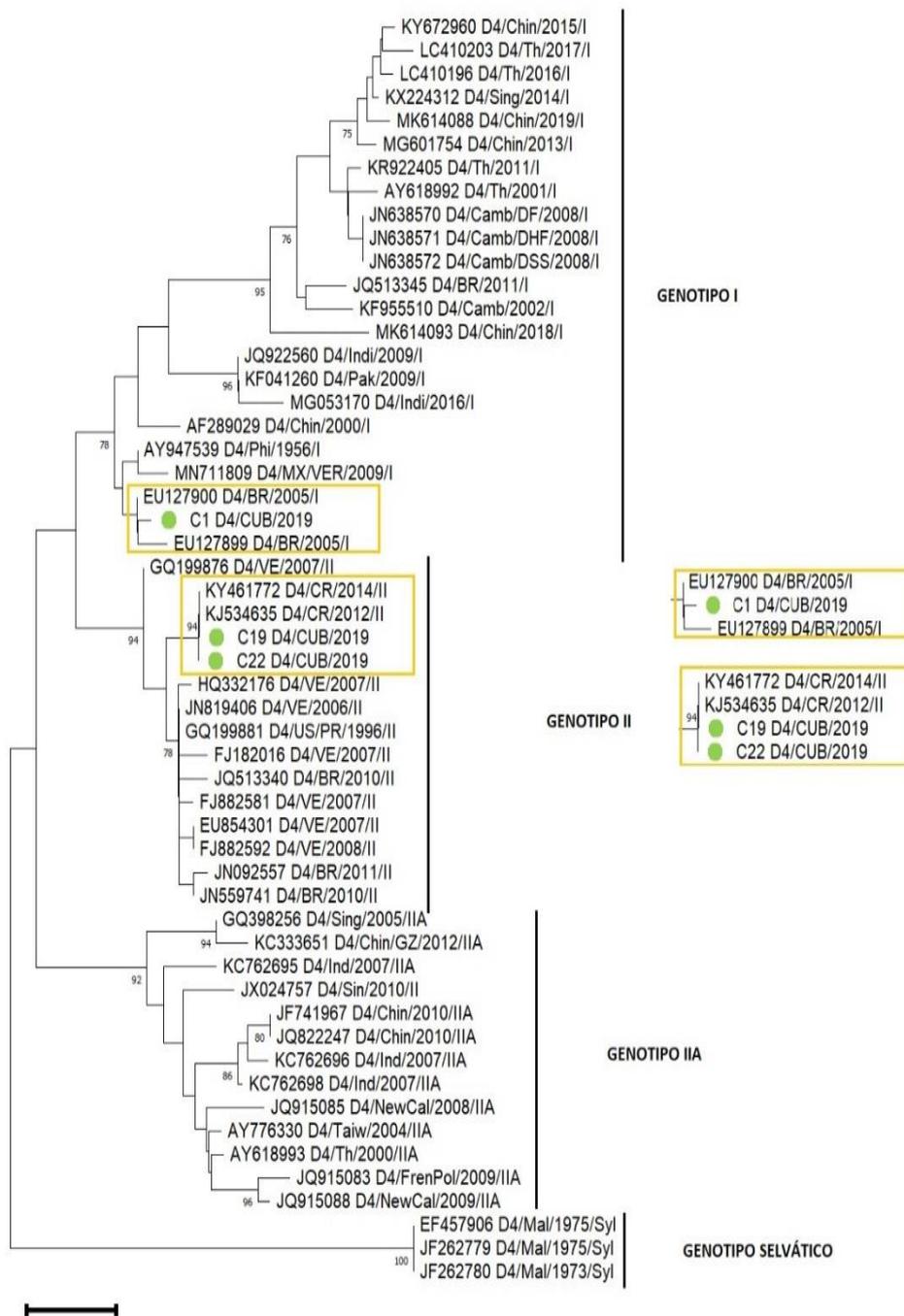


Figura 7. Árbol filogenético construido a partir del método de Neighbor-Joining con 54 secuencias de DENV-4 basado en el gen C/PrM (311 pb) utilizando datos brutos alojados en el repositorio público Genbank. Este árbol incluye dos nuevas secuencias agrupadas dentro del genotipo II, y una nueva secuencia agrupada dentro del genotipo I. Todas se indican con un círculo verde. Las longitudes de las ramas horizontales son proporcionales a la barra que representa la probabilidad de coalescencia. Las cepas de DENV se nombran de la siguiente manera: Número de acceso al GenBank/serotipo/país/año/genotipo. Se muestran los valores de soporte estadístico (bootstrap) superiores al 70% en los nodos.

4. Discusión

4.1 Detección y serotipificación de los virus del dengue

Los resultados expuestos en esta investigación constituyen el segundo estudio realizado en Cuba donde se detectó la transmisión vertical de los virus del dengue en *Ae. albopictus* (25). En un estudio previo se informó la ocurrencia de transmisión vertical de DENV-3 en cuatro de quince grupos analizados, lo que representó un 26,7% de positividad. Sin embargo, una limitación en este estudio fue que no se logró obtener ninguna secuencia de este serotipo que permitiera realizar un análisis filogenético. En la presente investigación se lograron detectar varios serotipos (DENV-2, DENV-3 y DENV-4) en estadios inmaduros de *Ae. albopictus* y se logró la secuenciación de los serotipos DENV-3 y DENV-4. Estos resultados resaltan la ocurrencia de la transmisión vertical de esta especie en Cuba y confirman que en las mismas áreas de salud dos especies del género *Aedes* son capaces de transmitir a su descendencia al menos un serotipo de dengue (25, 150).

Estudios anteriores informaron que, en condiciones de laboratorio, *Ae. albopictus* fue capaz de mantener la transmisión vertical durante 3 generaciones sucesivas de varios serotipos de dengue (151, 152). El primer informe en América de transmisión vertical en *Ae. albopictus* se realizó en Brasil en 1993, en el Estado de Minas Gerais, DENV-1 fue detectado por primera vez en estadios inmaduros de esta especie (153). Posteriormente durante un brote en México en 1995, se aisló DENV-2 y DENV-3 a partir de estadios inmaduros de la misma especie (154). La mayoría de los informes de *Ae. albopictus* infectados naturalmente con dengue y Zika provienen de Brasil (155), México (156), Colombia (157) y Costa Rica (158), países donde el dengue es endémico y entre 2014 y 2018 informaron transmisión activa también de Zika. Otros estudios muestran que esta especie también es capaz de transmitir el CHIKV eficientemente a su progenie durante 6 generaciones (159). Se plantea que la transmisión vertical es un mecanismo que puede contribuir al mantenimiento del virus en sus vectores naturales en períodos interepidémicos (160).

La rápida distribución de este vector se debe, al menos en parte, a su capacidad de entrar en diapausa. Un tipo específico de latencia que permite a las poblaciones sincronizar los períodos de crecimiento y reproducción con períodos de condiciones más favorables para su desarrollo (14). De esta manera, los huevos de *Ae. albopictus* en general, pueden resistir condiciones adversas para su desarrollo, si a este fenómeno se suma que pueden encontrarse potencialmente infectados con algún serotipo de dengue, le confiere mayor relevancia epidemiológica a esta especie. Estudios realizados por Lim *et al.* en 2020 plantean que simultáneamente al desarrollo larval ocurre la replicación viral activa, al llegar a la etapa adulta se infiere que el virus alcance las glándulas salivares, convirtiéndose en un vector capaz de transmitir el virus sin tener contacto previo con un humano virémico (161). La evidencia presentada en este estudio constituye una alerta para el desarrollo de futuras investigaciones que permitan dilucidar el rol que juega *Ae. albopictus* en la transmisión no solo de dengue sino también de Zika y otros arbovirus.

En dos municipios de La Habana, Cotorro y Arroyo Naranjo, se detectó la ocurrencia de transmisión vertical de dengue. Ambos municipios mantienen una elevada incidencia de dengue históricamente (LNRA). Por otro lado, no se detectaron grupos positivos en el resto de los municipios analizados en este estudio. Es importante destacar que estos resultados pudiesen encontrarse sesgados debido a la poca disponibilidad de especímenes colectados en estos municipios. Por ejemplo, entre los municipios de Playa y Guanabacoa se colectaron solamente 134 especímenes, 45 y 89, con los que se pudieron formar 2 y 4 grupos respectivamente. Algunos autores sugieren que el fenómeno de la transmisión vertical de los arbovirus no ocurre con elevada frecuencia. Ferreira-de-Lima *et al.*, en Brasil informaron un 0,34% de positividad para DENV-3 en 573 grupos analizados de *Ae. albopictus* (160). Lai *et al.*, en estudios realizados en condiciones de laboratorio, informaron una tasa de transmisión vertical de 2,6% para ZIKV (161). En la Isla La Reunión durante el brote de CHIKV de 2006 se aisló el virus en dos grupos (0,4%) de larvas de 500 formados (162).

En un estudio publicado por Gutiérrez-Bugallo *et al.* en 2018, se detectaron los cuatro serotipos de dengue circulando simultáneamente en las poblaciones de *Ae. aegypti* del municipio Arroyo Naranjo (24). En el mismo periodo se informó sobre la circulación simultánea de varios serotipos (DENV-2, DENV-3 y DENV-4) en la población humana (43). Varios estudios apuntan que, en Asia y Suramérica, los continentes donde principalmente se

informaron los casos de transmisión vertical en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (57), es frecuente detectar la circulación de varios serotipos simultáneamente (57, 134, 163). La evidencia presentada en este estudio, favorece la hipótesis de que este fenómeno pudiera sostener la heterocirculación de los DENV en áreas donde se informa anualmente una elevada incidencia de la enfermedad (132). La circulación simultánea de varios serotipos en un espacio y tiempo limitado es una de las principales causas de riesgo para el desarrollo de formas clínicas severas de dengue (164, 165). La vigilancia entomo-virológica molecular de los arbovirus en general, y de los DENV en particular, se presenta como una herramienta poderosa para el desarrollo de un sistema de alerta temprana contra posibles brotes de dengue en las regiones de mayor riesgo epidemiológico (165-167).

4.2 Distribución espacial de los DENV.

Los municipios donde se detectó la transmisión vertical de dengue en *Ae. albopictus*, Arroyo Naranjo y Cotorro, se ubican al centro sur y sureste de la provincia de La Habana respectivamente, comparten fronteras y son considerados municipios periurbanos. En el municipio de Arroyo Naranjo se detectaron grupos de larvas positivos para DENV-2, DENV3 y DENV-4 en las áreas de salud Mantilla, Grimau y Párraga. De manera similar en las áreas de salud de Cotorro, Efraín Mayor y Cuatro Caminos se detectaron los mismos serotipos. Estos municipios presentan deficiencias en el abastecimiento de agua, por lo que obliga a sus residentes a almacenarla frecuentemente. Existen estudios que sugieren una correlación entre la presencia de patios en las viviendas y los depósitos infectados con larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (66). En las provincias de Pinar del Rio y La Habana se observó que de manera general estas especies preferían los depósitos pequeños de agua, en lugares bajos, seguidos de neumáticos, latas y charcos (66, 168). Estudios realizados en La Habana por Marquetti *et al.* en 2018 informaron la domiciliación acelerada de *Ae. albopictus* desde las zonas rurales hacia las zonas periurbanas y urbanas entre 2010 y 2018 (17). En varios casos se observaron ambas especies (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*) compartiendo los mismos nichos ecológicos. En este estudio se alertó sobre la elevada proporción de los sitios de cría de *Ae. albopictus* (8-21,5%) dentro de las casas, un comportamiento que se mantuvo estable entre 2013 y 2018 y que no se observó desde la introducción de esta especie en 1995 (17). En Brasil

también se observó la rápida adaptación de *Ae. albopictus* a los ambientes urbanos y periurbanos (169). El acercamiento a los domicilios por parte de *Ae. albopictus* incrementa considerablemente el contacto vector-humano y a la vez el riesgo de expansión del dengue, puesto que, también podría transmitirse el virus en las áreas extradomiciliarias, como en los parques y áreas urbanas (3, 4).

La aparición de más de un serotipo en un mismo grupo de estadios inmaduros de *Ae. albopictus* podría darse por la inclusión de distintos ejemplares infectados con diferentes serotipos. Una característica de la hembra de *Ae. albopictus* es que no deposita la totalidad de sus huevos en un mismo sitio de cría, sino que es capaz de realizar varias ovipuestas luego de completar un ciclo gonadotrófico (170). Este comportamiento permite el éxito de esta especie en la colonización de la mayoría de los territorios y asegura a la vez su supervivencia. Paradójicamente, asegura la distribución heterogénea de los distintos serotipos de virus que portan. No resulta extraño encontrar en un mismo sitio de cría individuos provenientes de diferentes madres infectadas con distintos serotipos. La existencia de individuos infectados con varios serotipos tampoco es una teoría descartable Angel *et al.* en 2015 informaron la capacidad de un mismo vector de infectarse con múltiples serotipos, así como su capacidad de transmitirlos simultáneamente a su descendencia (133). Algunas investigaciones informaron como la replicación de un serotipo afectó negativamente la de otro distinto. La infección primaria en *Ae. aegypti* con DENV-4 provocó que fuera significativamente menos susceptible a una infección secundaria con DENV-2. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la replicación secundaria de DENV-4 cuando la infección primaria fue con DENV-2 (171). La competencia entre los serotipos de dengue en cultivos de células de mosquito puede causar una disminución significativa en los picos de la población viral, lo que podría traducirse en una disminución de la transmisión por el vector. Los efectos de la competencia fueron asimétricos entre el DENV-2 y el DENV-4, lo que probablemente refleja una variación significativa en la capacidad competitiva entre los serotipos en la naturaleza (172). Otros estudios observaron que el virus Sindbis (alfavirus) suprimió la replicación del DENV-4 en células C6/36 de *Ae. albopictus*, esta inhibición fue mayor cuando los dos arbovirus se inocularon simultáneamente en comparación a cuando se inocularon secuencialmente. Además, los mosquitos

expuestos simultáneamente a ambos arbovirus presentaron tasas de infección y diseminación significativamente menores que los expuestos únicamente a DENV-4 (173). Vazeille *et al.* en 2010 informaron la capacidad de *Ae. albopictus* de infectarse simultáneamente por vía oral con CHIKV y DENV y la capacidad para generar partículas infecciosas para ambos arbovirus simultáneamente (174). En cualquier caso, la detección en un mismo grupo de estadios inmaduros de mosquitos de varios serotipos de dengue, ratifica la circulación endémica de los DENV en estos municipios y también el incremento del riesgo de padecer las formas graves de la enfermedad en cualquier pico epidémico.

En las áreas de salud donde se detectó una heterocirculación de los serotipos de DENV existe un flujo considerable de personal. Se estima que el 75% de los casos de dengue que se informan en el mundo son asintomáticos (175). Las personas que desarrollan una infección asintomática de dengue juegan un papel fundamental en la dinámica de la transmisión ya que generalmente los sistemas de vigilancia clínica no están capacitados para detectarlas. Sin embargo, existen estudios que demuestran que son capaces de infectar eficientemente un vector, e incluso que contribuyen significativamente más a la propagación del virus (37). Las personas virémicas, sin síntomas clínicos aparentes, no interrumpen sus actividades diarias y por lo tanto están más expuestas a entrar en contacto con un vector (37). Una combinación de infección asintomática por el DENV en humanos y el movimiento de personas virémicas puede ser una de los factores asociados a la detección de varios serotipos en una región determinada. Dada las limitaciones en el rango de vuelo de *Ae. albopictus* (68), se postula que es la movilidad humana, uno de los factores de mayor importancia que determinan la amplificación y distribución de los DENV (176).

La detección de un serotipo de dengue en estadios inmaduros de *Ae. albopictus*, es una evidencia que un mosquito hembra se alimentó de un humano virémico y en última instancia fue capaz de transmitir ese serotipo a su descendencia. Por tanto, los resultados deberían guardar cierta relación entre lo encontrado en muestras entomológicas y clínicas. En La Habana en 2018 se informó la circulación casi exclusiva, en muestras clínicas, del serotipo 2 mientras que en el periodo 2019-2021 se informó la

circulación simultánea de los serotipos 1 y 2. El serotipo 3 no se detectó en muestras clínicas desde 2018, mientras que el serotipo 4 no se encontró en los sueros de pacientes desde 2016 en Cuba según los datos recogidos en el LNRA del IPK. Sin embargo, en el transcurso del año 2022 se detectó la circulación de los cuatro serotipos de dengue con un evidente incremento del serotipo 3 (LNRA). Algunas investigaciones relacionan las proporciones de dengue que circulan entre los mosquitos y las poblaciones humanas en un espacio y tiempo determinados, y la variabilidad que presentan. En Filipinas durante un pico de dengue en 2015 se llevó a cabo un estudio de vigilancia sobre el DENV en *Ae. aegypti* adultos en hogares de pacientes sospechosos para evaluar la tasa de infección de mosquitos, como resultado se informó la cocirculación de los mismos serotipos y genotipos en pacientes y mosquitos (177). Chung *et al.*, informaron la variación en la circulación espacial y temporal de los DENV en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* entre 1997 y 2000 en Singapur (178). En este estudio se informó la circulación de 3 serotipos de dengue en sueros humanos, mientras que entre 1997 y 1999 en las poblaciones inmaduras de ambos vectores se detectaron los cuatro serotipos. Sin embargo, en el 2000 solamente se observó la circulación de DENV-1 y DENV-2 en larvas de *Ae. albopictus* (178). En Sri Lanka durante el pico de un brote de dengue se identificó la circulación de los cuatro serotipos de dengue en larvas de *Aedes* en un área de 400 metros alrededor de la casa de los pacientes hospitalizados. Mientras que los cuatro serotipos de dengue se detectaron en larvas de *Ae. albopictus*, que fue la forma vectorial inmadura prominente identificada durante todo el periodo de estudio y mostró las mayores tasas de transmisión vertical, en *Ae. aegypti* no logró identificarse el DENV-4 (23).

Las tasas de infección y transmisión en *Ae. albopictus* varían significativamente entre los arbovirus incluso entre los serotipos de DENV (161, 179, 180). *Aedes albopictus* fue capaz de desarrollar elevadas tasas de infección para todos los serotipos de DENV (determinada a partir de la proporción de mosquitos con abdómenes infectados con relación al total) (180). Sin embargo, la probabilidad de desarrollar saliva infecciosa fue significativamente menor para los serotipos de DENV-2 y DENV-4 en comparación con DENV-1 y DENV-3 (180). Ensayos experimentales mostraron tasas significativamente más elevadas de transmisión vertical para los DENV en *Ae. albopictus* que en *Ae. aegypti*

(181). En estudios naturales las tasas de transmisión vertical resultaron significativamente más bajas. Las mayores tasas de transmisión vertical se observaron para DENV-1 seguida de DENV-4 y sin diferencias significativas entre DENV-2 y DENV-3 (181).

En nuestro estudio no se detectó DENV-1 en las muestras entomológicas, incluso cuando en el mismo periodo se informó su circulación en muestras clínicas. Aunque DENV-1 generalmente manifiesta las mayores tasas de transmisión vertical, la interacción para un par hospedero-patógeno es única y está determinada en gran medida por interacciones genotipo-genotipo, por lo que el resultado de la infección y de la transmisión se encuentra afectado por factores (genéticos) intrínsecos (182, 183). Dado que una población y una cepa viral pueden establecer tasas de transmisión vertical propias de este par y diferentes de otro sistema *Ae. albopictus*-DENV (184, 185), se infiere que este fenómeno pudo influir en la no aparición de DENV-1 en estadios inmaduros de los municipios positivos.

4.3 Genotipificación de los DENV.

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores de riesgos para padecer las formas graves de la enfermedad es precisamente una infección secuencial con un serotipo distinto de dengue. Algunas investigaciones apuntan a que la infección con determinados genotipos aumenta las posibilidades de desarrollar síntomas severos (54).

Los procesos de secuenciación mediante el método de Sanger necesitan de un ADN de elevada pureza puesto que los componentes inespecíficos en la reacción pueden interferir en el resultado final (149). En nuestro caso no logramos obtener secuencias de DENV-2 de calidad apropiada para desarrollar el análisis filogenético. Una posible explicación podría estar en el kit utilizado para la purificación de los fragmentos de la “nested” (Qiaquick PCR purification Kit). Según las recomendaciones del fabricante, el estuche comercial es ideal para fragmentos superiores a 100 pb, nuestro fragmento a purificar fue de 119 pb, por lo que se encontraba en el límite inferior de confiabilidad que sugiere el fabricante, lo que pudo incidir en el bajo rendimiento del producto final

de la purificación. Según se describe en la guía para usuarios para la secuenciación por el método de Sanger, los productos de PCR menores de 250 pb resultan en secuencias de baja calidad debido a un fenómeno de sobresaturación y a la compresión de bases al principio de la lectura de secuenciación, que es una limitación inherente a la tecnología 3730xl que se utiliza en estos equipos (146). Cuando los fragmentos son tan pequeños aumenta la probabilidad que las cadenas de ADN con polaridad inversa hibriden entre sí de manera similar a como puede ocurrir con las secuencias de primer que no se unen a la cadena principal. Esto genera competencia en la reacción y afecta la eficiencia de la secuenciación. Una situación similar informaron Gutiérrez-Bugallo *et al.* en 2017 (24).

El análisis de soporte estadístico (bootstrap) es una técnica sencilla y eficaz para comprobar la estabilidad relativa de los grupos dentro de un árbol filogenético. En general, en circunstancias normales, pueden ser confiables las ramas o grupos con un valor de soporte superior al 70%; por el contrario, las ramas con un valor de soporte inferior deben interpretarse con precaución (186). Los valores en los nodos de los árboles filogenéticos de este estudio fueron inferiores a 70%. Estos valores se obtienen cuando longitud de las secuencias que se emplean en para realizar el análisis filogenético son relativamente cortas (311 pb para DENV-4 y 233 pb para DENV-3). En contraste, secuencias de mayor longitud ofrecen mayor cantidad de información y a su vez mayor confiabilidad en el resultado final. Por ejemplo, en la secuenciación del gen de envoltura E se utilizan 8 cebadores que amplifican un fragmento considerablemente más largo (hasta 1800 pb). Sin embargo, el punto débil de utilizar el gen E es la degradación a la que es susceptible el ARN viral al pasar un largo tiempo. La secuenciación de genomas completos mediante la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) brinda la información más completa para realizar un análisis filogenético. Sin embargo, el costo es muy elevado para la mayoría de los laboratorios y se necesita de personal altamente capacitado. A pesar de esto, las secuencias obtenidas en el presente trabajo coincidieron con los genotipos que circularon en Cuba y la región latinoamericana en el período de estudio, lo que apoya la certeza y valor de estos resultados.

4.3.1 DENV-3

En septiembre de 2000, se confirmaron 138 casos de dengue durante un pequeño brote en la Habana, el agente etiológico identificado fue DENV-3, por primera vez en Cuba. En este periodo no se informó ningún caso de dengue severo asociado a este serotipo (187). A partir de entonces, este serotipo se identificó en varias epidemias y se vinculó a casos severos de dengue. Esto ratifica la importancia del monitoreo de los serotipos y genotipos que circulan, así como la voz de alerta oportuna a los servicios de salud (188).

En el análisis filogenético puede observarse que la secuencia de DENV-3 obtenida en este estudio se agrupó junto con otras secuencias del genotipo III descargadas del GenBank. La secuencia (C26 D3/CUB/2019) se relacionó filogenéticamente con otros virus que circularon en Nicaragua y Perú entre 2008 y 2010 obtenidas a partir de muestras clínicas. Durante la epidemia que tuvo lugar en la Habana durante 2001-2002 se observó un aumento en la gravedad de los casos de dengue. Se postula que la infección consecutiva de DENV-1 seguida de DENV-3 (DENV-1/DENV-3) constituyó la causa principal del aumento de estos casos graves (188). El análisis filogenético bayesiano de las secuencias consenso reveló que, en ese momento, en La Habana circularon dos linajes de DENV-3, ambos agrupados dentro del genotipo III. El linaje predominante se encontraba estrechamente relacionado con las cepas ecuatorianas y peruanas, mientras que el linaje menor se relacionaba con las cepas venezolanas (189). Estudios realizados durante el periodo 2010-2014 en Cuba, basados en el gen de envoltura, de aislamientos de DENV-3 a partir de sueros humanos, revelaron una cercana relación filogenética con virus que circularon en Venezuela y Colombia (43). Ambos estudios sugieren una evolución *in situ* del DENV-3 en Cuba a lo largo de los últimos años y confirman los diferentes orígenes de los linajes que circulan en la población.

El genotipo III se postula que fue reintroducido en la región de América Latina en 1994, específicamente en Nicaragua y Panamá, luego de 17 años (42). La secuencia de este estudio compartió un origen común junto con otras dos secuencias (número de acceso: KT726345 y KT726343) obtenidas a partir de aislados virales presentes en muestras clínicas durante la epidemia de dengue en Cuba en 2002 (190). Este genotipo

se encontró también en muestras clínicas provenientes de varias regiones del país, La Habana/2009, Santiago de Cuba/2010 y 2011, Camagüey/2011 y Sancti Spiritus/2014 (43). Estudios recientes informan la circulación de este genotipo también durante la epidemia ocurrida durante 2022 en Cuba (datos sin publicar). Desafortunadamente, la ausencia de otras secuencias cubanas publicadas del gen C/PrM tanto en muestras entomológicas como humanas, impide realizar un análisis más profundo sobre la dinámica de transmisión y evolución viral.

4.3.2 DENV-4

En nuestro estudio se obtuvieron 3 secuencias de DENV-4. Dos secuencias (C22 D4/CUB2019 y C19 D4) se agruparon dentro del genotipo II, mientras que otra secuencia (C1 D4/CUB/2019) se agrupó dentro del genotipo I.

El genotipo II circula en la región de América Latina desde 1981, y se postula que tiene su origen en Asia (203). Este genotipo se vincula a casos de fiebre y en algunas ocasiones a formas graves de la enfermedad en Suramérica y el Caribe (192, 193). En la epidemia de 2006 este genotipo se asoció a manifestaciones graves de dengue (43). También se observó el mismo serotipo en pacientes sintomáticos procedentes de La Habana, Las Tunas, Santiago de Cuba y Guantánamo durante el periodo 2010-2014 (43). Las secuencias de este genotipo mostraron una relación nucleotídica cercana (>99%) con otras secuencias virales que circularon durante 2012 aisladas de diferentes hospederos en Costa Rica. Las secuencias KJ534635 y KY461772 se obtuvieron a partir de virus aislados de *Ae. albopictus* procedentes de una plantación de piñas (158) y *Rhogeessa tumida* (194) respectivamente. Esta última es una especie de murciélagos que habita cerca de poblaciones humanas y se alimenta preferentemente de mosquitos, motivo por el que se postula pudo haberse detectado la presencia del virus en el intestino de los mamíferos (194). En ninguna de estas localidades de Costa Rica donde circuló este genotipo se informaron casos graves de dengue. Podemos inferir por el análisis filogenético que las secuencias del genotipo II que se detectaron antes y después de 2019 comparten un ancestro común con otras que circularon en Venezuela y Colombia entre los años 2006 y 2010 donde este serotipo es endémico. Sin embargo, debido a la

poca disponibilidad de secuencias cubanas del gen C/PrM tanto de humanos como de muestras entomológicas durante este periodo 2016-2019, resulta muy complejo profundizar en esta hipótesis.

La secuencia (C1 D4/CUB/2019) se agrupó junto con otras secuencias aisladas de sueros humanos en 2005 en la localidad de Manaus, capital del Estado de Amazonas, Brasil. Posteriormente en 2011 se aisló este genotipo a partir de un suero humano en la localidad de Salvador, estado de Bahía, Brasil. Los análisis filogeográficos concluyeron que el genotipo I fue introducido en ese país desde el sudeste asiático (195). En 2009 también se aisló DENV-4 a partir de dos sueros de pacientes en fase aguda y las secuencias obtenidas se agruparon dentro del genotipo I y se relacionaron a otras provenientes de Asia (196). En base a estos estudios, podemos inferir que este genotipo no se relaciona con grandes epidemias ni con casos graves de la enfermedad en Latinoamérica y el Caribe. Su circulación se asocia generalmente a repetidas Introducciones desde Asia. Es probable que este genotipo fuese introducido en Cuba desde Brasil, a través del arribo a Cuba simultáneamente de todo el personal médico que colaboró en el Programa Más Médicos que concluyó en 2019.

Los resultados de esta investigación demuestran por primera vez en Cuba la posibilidad de obtener secuencias de DENV a partir de estadios inmaduros de *Ae. albopictus* colectados en el terreno. De esta manera, la puesta en práctica de los procedimientos descritos podría aportar a los sistemas cubanos de vigilancia arboviroológica información adicional, no solo sobre los serotipos virales y sus genotipos, también sobre los virus que circulan en la naturaleza, incluso antes de provocar un brote de dengue.

5. Conclusiones

- Se detectó la presencia de los virus del dengue en estadios inmaduros de *Ae. albopictus* en los municipios de Arroyo Naranjo y Cotorro de La Habana, lo que demuestra la capacidad de esta especie para transmitir los virus a su descendencia y la importancia del control de las poblaciones de este vector para la prevención de posibles brotes de dengue. A su vez refuerza los informes anteriores de transmisión vertical realizados en culícidos del género *Aedes*.
- La aparición de tres de los cuatro serotipos de dengue en las poblaciones inmaduras de *Ae. albopictus* en los municipios Arroyo Naranjo y Cotorro de La Habana en 2019, sugiere una circulación sostenida en el vector.
- La identificación de los serotipos de dengue y la obtención de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los serotipos 3 y 4, permitió identificar los genotipos que circularon en las poblaciones de *Ae. albopictus*. Estos coincidieron con los que circularon en las poblaciones humanas de Suramérica, El Caribe y las posteriores epidemias de dengue que sucedieron en Cuba.

6. Recomendaciones

- Extender este estudio a otros territorios del país donde exista un registro de historia epidemiológica de dengue para profundizar en la capacidad de las poblaciones de *Ae. albopictus* de Cuba para transmitir verticalmente los DENV.
- Realizar investigaciones de terreno y laboratorio (ensayos de competencia vectorial) que permitan esclarecer el rol de *Ae. albopictus* como posible vector de los DENV en el contexto cubano.
- Realizar la secuenciación de genomas completos, o al menos del gen de envoltura de los virus del dengue. Desarrollar análisis filogenéticos más rigurosos que proporcionen mayor confiabilidad en la inferencia de la historia evolutiva de las cepas virales.
- Desarrollar estudios de transmisión vertical para otros arbovirus que pueden circular de manera silente en las poblaciones de *Ae. albopictus*.
- Colocar los resultados de esta tesis en manos de las autoridades de Salud Pública para la evaluación de este método de vigilancia virológica y las ventajas que ofrece en la práctica la detección oportuna de los virus del dengue en las poblaciones inmaduras de vectores para prevenir posibles brotes de esta enfermedad.

7. Bibliografía

1. 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 Biol Sci.* 2011;278(1717):2446-54.
2. Izri A, Bitam I, Charrel RN. First entomological documentation of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(7):1116-8.
3. Tsuda Y, Maekawa Y, Ogawa K, Itokawa K, Komagata O, Sasaki T, *et al.* Biting Density and Distribution of *Aedes albopictus* during the September 2014 Outbreak of Dengue Fever in Yoyogi Park and the Vicinity of Tokyo Metropolis, Japan. *Japanese journal of infectious diseases.* 2016;69(1):1-5.
4. Kobayashi D, Murota K, Fujita R, Itokawa K, Kotaki A, Moi ML, *et al.* Dengue Virus Infection in *Aedes albopictus* during the 2014 Autochthonous Dengue Outbreak in Tokyo Metropolis, Japan. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2018;98(5):1460-8.
5. Brady OJ, Hay SI. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. *Annual review of entomology.* 2020;65:191-208.
6. Kuno G. Revisiting Houston and Memphis: the background histories behind the discovery of the infestation by *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United States and their significance in the contemporary research. *Journal of medical entomology.* 2012;49(6):1163-76.
7. Jones R, Kulkarni MA, Davidson TMV, Talbot B. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. *PloS one.* 2020;15(2):e0220753.
8. Eskildsen GA, Rovira JR, Smith O, Miller MJ, Bennett KL, McMillan WO, *et al.* Maternal invasion history of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* into the Isthmus of Panama: Implications for the control of emergent viral disease agents. *PloS one.* 2018;13(3):e0194874.
9. Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* under changing climate. *PloS one.* 2018;13(12):e0210122.

10. Giordano BV, Gasparotto A, Liang P, Nelder MP, Russell C, Hunter FF. Discovery of an *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* population and first records of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* in Canada. *Medical and veterinary entomology*. 2020;34(1):10-6.
11. Gossner CM, Ducheyne E, Schaffner F. Increased risk for autochthonous vector-borne infections transmitted by *Aedes albopictus* in continental Europe. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2018;23(24).
12. Oliveira S, Rocha J, Sousa CA, Capinha C. Wide and increasing suitability for *Aedes albopictus* in Europe is congruent across distribution models. *Scientific reports*. 2021;11(1):9916.
13. Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association Supplement*. 1988;1:1-39.
14. Reynolds JA, Poelchau MF, Rahman Z, Armbruster PA, Denlinger DL. Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of insect physiology*. 2012;58(7):966-73.
15. Gamez S, Antoshechkin I, Mendez-Sanchez SC, Akbari OS. The Developmental Transcriptome of *Aedes albopictus*, a Major Worldwide Human Disease Vector. *G3 (Bethesda, Md)*. 2020;10(3):1051-62.
16. Broche RG, Borja EM. *Aedes albopictus* in Cuba. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999;15(4):569-70.
17. Marquetti MC, Castillo M, Peraza I, al. e. Initial Evidence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Domiciliation in Havana City, Cuba 1995-2018. Available at Research Square. 2020: PREPRINT (Version 1).
18. 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*. *Medical and veterinary entomology*. 2019;33(3):437-42.
19. Gómez-Palacio A, Suaza-Vasco J, Castaño S, Triana O, Uribe S. *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*. 2017;37(0):135-42.
20. Günther J, Martínez-Muñoz JP, Pérez-Ishiwara DG, Salas-Benito J. Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico. *Intervirology*. 2007;50(5):347-52.
21. Ahmad R, Ismail A, Saat Z, Lim LH. Detection of dengue virus from field *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* adults and larvae. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28(1):138-42.

22. 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. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*. 2011;36(1):147-52.
23. Wijesinghe C, Gunatilake J, Kusumawathie PHD, Sirisena P, Daulagala S, Iqbal BN, *et al*. Circulating dengue virus serotypes and vertical transmission in *Aedes* larvae during outbreak and inter-outbreak seasons in a high dengue risk area of Sri Lanka. *Parasites & vectors*. 2021;14(1):614.
24. Gutiérrez-Bugallo G. 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. La Habana: Universidad de La Habana; 2017.
25. Piedra LA, Martinez LC, Ruiz A, Vazquez JR, Guzman MG, Rey J, *et al*. First Record of Natural Transovarial Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus* from Cuba. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2021;106(2):582-4.
26. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al*. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-8.
27. Harapan H, Michie A, Sasmono RT, Imrie A. Dengue: A Minireview. *Viruses*. 2020;12(8).
28. Finizola Celli F. [Basic standards in handling patients with dengue fever, hemorrhagic dengue and dengue shock]. *Acta científica venezolana*. 1998;49 Suppl 1:18-24.
29. Halstead SB. Dengue. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9599):1644-52.
30. Horstick O, Martinez E, Guzman MG, Martin JL, Ranzinger SR. WHO dengue case classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathogens and global health*. 2015;109(1):19-25.
31. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. Geneva: World Health Organization. Copyright © 2009, World Health Organization.; 2009.
32. Williams M, Mayer SV, Johnson WL, Chen R, Volkova E, Vilcarrromero S, *et al*. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is associated with a severe dengue outbreak in the Peruvian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;91(3):611-20.

33. Thach TQ, Eisa HG, Hmeda AB, Faraj H, Thuan TM, Abdelrahman MM, *et al.* Predictive markers for the early prognosis of dengue severity: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2021;15(10):e0009808.
34. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(6):712-23.
35. Yang X, Quam MBM, Zhang T, Sang S. Global burden for dengue and the evolving pattern in the past 30 years. *Journal of travel medicine*. 2021;28(8).
36. Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Front Immunol*. 2014;5:290.
37. Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, *et al.* Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(47):14688-93.
38. Pittaluga G. Sobre un brote de engue en La Habana. *Rev Med Trop Paras Bact Clin y Lab*. 1945;11(1).
39. Mas P. Dengue fever in Cuba in 1977: some laboratory aspects. PAHO Scientific Publication. 1979;375:40-3.
40. Guzmán MG, Kourí G, Martínez E, Bravo J, Riverón R, Soler M, *et al.* Clinical and serologic study of Cuban children with dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Bull Pan Am Health Organ*. 1987;21(3):270-9.
41. Guzmán MG, Alvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vázquez S, Vald s L, *et al.* Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 1999;3(3):130-5.
42. Guzmán MG, Vázquez S, Martínez E, Alvarez M, Rodríguez R, Kourí G, *et al.* [Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas]. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana Pan American Sanitary Bureau*. 1996;121(2):102-10.
43. Díaz G. *Molecular epidemiology of dengue viruses in Cuba, 2009-2014*. Havana: University of Havana; 2014.
44. Brett D, Lindenbach CLM, Heinz-Jurgen T, Charles MR. *Flaviviridae*. In: David M. Knipe PMH, editor. *Fields virology*. II. Philadelphia, PA 19103 USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 712-45.

45. Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol.* 2000;74(7):3227-34.
46. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2003;3(1):19-28.
47. Brady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MU, Messina JP, Reiner RC, Jr., *et al.* Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasites & vectors.* 2014;7:338.
48. Villabona-Arenas CJ, Zanotto PM. Worldwide spread of Dengue virus type 1. *PloS one.* 2013;8(5):e62649.
49. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2009;9(4):523-40.
50. Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.* 1992;122(2):281-8.
51. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1001005.
52. Holmes EC. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. *J Virol.* 2003;77(20):11296-8.
53. Choudhury MA, Lott WB, Aaskov J. Distribution of fitness in populations of dengue viruses. *PloS one.* 2014;9(9):e107264.
54. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, *et al.* Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51.
55. Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, *et al.* Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS neglected tropical diseases.* 2010;4(7):e757.
56. Shrivastava A, Soni M, Shrivastava S, Sharma S, Dash PK, Gopalan N, *et al.* Lineage shift of dengue virus in Eastern India: an increased implication for DHF/DSS. *Epidemiology and infection.* 2015;143(8):1599-605.

57. Ferreira-de-Lima VH, Lima-Camara TN. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasites & vectors*. 2018;11(1):77.
58. Chen LH, Wilson ME. Update on non-vector transmission of dengue: relevant studies with Zika and other flaviviruses. *Tropical diseases, travel medicine and vaccines*. 2016;2:15.
59. Molton JS, Low I, Choy MMJ, Aw PPK, Hibberd ML, Tambyah PA, *et al*. Dengue virus not detected in human semen. *Journal of travel medicine*. 2018;25(1).
60. Xiong Y, Chen Q. [Epidemiology of dengue fever in China since 1978]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2014;34(12):1822-5.
61. Díaz Y, Chen-Germán M, Quiroz E, Carrera JP, Cisneros J, Moreno B, *et al*. Molecular Epidemiology of Dengue in Panama: 25 Years of Circulation. *Viruses*. 2019;11(8).
62. Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):816-20.
63. Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Seminars in immunopathology*. 2017;39(5):563-74.
64. Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol*. 2013;29(9):460-8.
65. Reiter P. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14(1):83-94.
66. Pérez Castillo M, Mendizábal Alcalá ME, Peraza Cuesta I, Molina Torriente RE, Marquetti Fernández MdC. Distribución espacial y temporal de los sitios de cría de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) en La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2014;66:252-62.
67. Tippelt L, Werner D, Kampen H. Tolerance of three *Aedes albopictus* strains (Diptera: Culicidae) from different geographical origins towards winter temperatures under field conditions in northern Germany. *PLoS one*. 2019;14(7):e0219553.
68. Marini F, Caputo B, Pombi M, Tarsitani G, della Torre A. Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. *Medical and veterinary entomology*. 2010;24(4):361-8.

69. Bellini R, Albieri A, Balestrino F, Carrieri M, Porretta D, Urbanelli S, *et al.* Dispersal and survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) males in Italian urban areas and significance for sterile insect technique application. *Journal of medical entomology*. 2010;47(6):1082-91.
70. Vavassori L, Saddler A, Müller P. Active dispersal of *Aedes albopictus*: a mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasites & vectors*. 2019;12(1):583.
71. 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*. 2010;2010(10):pdb.emo141.
72. Kamgang B, Nchoutpouen E, Simard F, Paupy C. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasites & vectors*. 2012;5:57.
73. Ponlawat A, Harrington LC. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. *Journal of medical entomology*. 2005;42(5):844-9.
74. 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. *Journal of medical entomology*. 2006;43(3):543-51.
75. Valerio L, Marini F, Bongiorno G, Facchinelli L, Pombi M, Caputo B, *et al.* Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in urban and rural contexts within Rome province, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(3):291-4.
76. Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, *et al.* Mosquitoes and their Control. In: Springer H, editor. 2010. p. 577 p.
77. Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal of medical entomology*. 2009;46(1):33-41.
78. Ngoagouni C, Kamgang B, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasites & vectors*. 2015;8:191.
79. Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(1):115-37.
80. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(5):886-92.

81. Higgs S, Beaty B. *Biology of Disease Vectors: Natural cycles of vector-borne pathogens*: Elsevier Academic Press; 2005.
82. Lwande OW, Obanda V, Lindström A, Ahlm C, Evander M, Näslund J, *et al.* Globe-Trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Risk Factors for Arbovirus Pandemics. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020;20(2):71-81.
83. Garcia-Rejon JE, Navarro JC, Cigarroa-Toledo N, Baak-Baak CM. An Updated Review of the Invasive *Aedes albopictus* in the Americas; Geographical Distribution, Host Feeding Patterns, Arbovirus Infection, and the Potential for Vertical Transmission of Dengue Virus. *Insects.* 2021;12(11).
84. Moore CG, Mitchell CJ. *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis.* 1997;3(3):329-34.
85. Rohani P. The link between dengue incidence and El Niño southern oscillation. *PLoS medicine.* 2009;6(11):e1000185.
86. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):e201.
87. Nuckols JT, Huang YJ, Higgs S, Miller AL, Pyles RB, Spratt HM, *et al.* Evaluation of Simultaneous Transmission of Chikungunya Virus and Dengue Virus Type 2 in Infected *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology.* 2015;52(3):447-51.
88. Bara J, Rapti Z, Cáceres CE, Muturi EJ. Effect of Larval Competition on Extrinsic Incubation Period and Vectorial Capacity of *Aedes albopictus* for Dengue Virus. *PloS one.* 2015;10(5):e0126703.
89. Ye YH, Chenoweth SF, Carrasco AM, Allen SL, Frentiu FD, van den Hurk AF, *et al.* Evolutionary potential of the extrinsic incubation period of dengue virus in *Aedes aegypti*. *Evolution; international journal of organic evolution.* 2016;70(11):2459-69.
90. Ekwudu O, Marquart L, Webb L, Lowry KS, Devine GJ, Hugo LE, *et al.* Effect of Serotype and Strain Diversity on Dengue Virus Replication in Australian Mosquito Vectors. *Pathogens (Basel, Switzerland).* 2020;9(8).
91. Quintero G, Diana C, Osorio B, Jorge E, Martínez-Gutiérrez M. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia [en línea].* 2010;23(2):146-56[fecha de Consulta 30 de Diciembre de 2022].
92. Forrester NL, Coffey LL, Weaver SC. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses.* 2014;6(10):3991-4004.

93. Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 2015;7(7):3741-67.
94. Ma E, Zhu Y, Liu Z, Wei T, Wang P, Cheng G. Interaction of Viruses with the Insect Intestine. *Annual review of virology*. 2021;8(1):115-31.
95. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(16):2773-86.
96. Mercado-Curiel RF, Esquinca-Avilés HA, Tovar R, Díaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Muñoz Mde L. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol*. 2006;6:85.
97. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol*. 2008;89(Pt 2):474-84.
98. Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*. 2008;378(1):193-9.
99. Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*. 2014;6(11):4479-504.
100. Severson DW, Behura SK. Genome Investigations of Vector Competence in *Aedes aegypti* to Inform Novel Arbovirus Disease Control Approaches. *Insects*. 2016;7(4).
101. Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual review of entomology*. 2009;54:285-302.
102. 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*. 2008;8(5):701-12.
103. Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2001;47(2):119-25.
104. Cui Y, Grant DG, Lin J, Yu X, Franz AWE. Zika Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes aegypti* is Facilitated by Bloodmeal-Mediated Structural Modification of the Midgut Basal Lamina. *Viruses*. 2019;11(11).
105. Yurchenco PD, O'Rear JJ. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol*. 1994;6(5):674-81.

106. Romoser WS, Wasieloski LP, Jr., Pushko P, Kondig JP, Lerdthusnee K, Neira M, *et al.* Evidence for arbovirus dissemination conduits from the mosquito (Diptera: Culicidae) midgut. *Journal of medical entomology*. 2004;41(3):467-75.
107. Passarelli AL. Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology*. 2011;411(2):383-92.
108. Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Rev Mol Med*. 2019;21:e1.
109. Cao-Lormeau VM. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Viol J*. 2009;6:35.
110. Wang H, Gort T, Boyle DL, RJ C. Effects of manipulating apoptosis on Sindbis virus infection of *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Virol Methods*. 2012;86:6546-54.
111. O'Neill K, Olson BJ, Huang N, Unis D, Clem RJ. Rapid selection against arbovirus-induced apoptosis during infection of a mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(10):E1152-61.
112. Pierro DJ, Powers EL, Olson KE. Genetic determinants of Sindbis virus strain TR339 affecting midgut infection in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 5):1545-54.
113. 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*. *Viol J*. 2013;10:257.
114. Hanley KA, Nelson JT, Schirtzinger EE, Whitehead SS, Hanson CT. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. *BMC ecology*. 2008;8:1.
115. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(7):e1000098.
116. Smartt CT, Shin D, Alto BW. Dengue serotype-specific immune response in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2017;112(12):829-37.
117. Russell TA, Ayaz A, Davidson AD, Fernandez-Sesma A, Maringer K. Imd pathway-specific immune assays reveal NF- κ B stimulation by viral RNA PAMPs in *Aedes aegypti* Aag2 cells. *PLoS neglected tropical diseases*. 2021;15(2):e0008524.
118. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(42):17841-6.

119. Olson KE, Blair CD. Arbovirus-mosquito interactions: RNAi pathway. *Curr Opin Virol.* 2015;15:119-26.
120. Zuo S, Zhao Q, Guo X, Zhou H, Cao W, Zhang J. Detection of Quang Binh virus from mosquitoes in China. *Virus Res.* 2014;180:31-8.
121. Scherer C, Knowles J, Sreenu VB, Fredericks AC, Fuss J, Maringer K, *et al.* An *Aedes aegypti*-Derived Ago2 Knockout Cell Line to Investigate Arbovirus Infections. *Viruses.* 2021;13(6).
122. Bernhardt SA, Simmons MP, Olson KE, Beaty BJ, Blair CD, Black WC. Rapid intraspecific evolution of miRNA and siRNA genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS one.* 2012;7(9):e44198.
123. Lambrechts L, Quillery E, Noël V, Richardson JH, Jarman RG, Scott TW, *et al.* Specificity of resistance to dengue virus isolates is associated with genotypes of the mosquito antiviral gene Dicer-2. *Proc Biol Sci.* 2013;280(1751):20122437.
124. Sim S, Aw PP, Wilm A, Teoh G, Hue KD, Nguyen NM, *et al.* Tracking Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity during Human-to-Mosquito Transmission. *PLoS neglected tropical diseases.* 2015;9(9):e0004052.
125. Lequime S, Fontaine A, Ar Gouilh M, Moltini-Conclois I, Lambrechts L. Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS genetics.* 2016;12(6):e1006111.
126. Fine PE. Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Ann N Y Acad Sci.* 1975;266:173-94.
127. Ebert D. The Epidemiology and Evolution of Symbionts with Mixed-Mode Transmission. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics.* 2013;44:623-43.
128. Lequime S, Lambrechts L. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.* 2014;28:681-90.
129. Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS Pathog.* 2016;12(5):e1005548.
130. 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.* 2011;6(12):e29555.
131. 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.* 2014;11:61.

132. Esteva L, Vargas C. Influence of vertical and mechanical transmission on the dynamics of dengue disease. *Math Biosci.* 2000;167(1):51-64.
133. Angel B, Angel A, Joshi V. Multiple dengue virus types harbored by individual mosquitoes. *Acta Trop.* 2015;150:107-10.
134. Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo 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, Ceará, Brazil. *PloS one.* 2012;7(7):e41386.
135. Martínez NE, Dzul-Manzanilla F, Gutiérrez-Castro C, Ibarra-López J, Bibiano-Marín W, López-Damián L, *et al.* Natural vertical transmission of dengue-1 virus in *Aedes aegypti* populations in Acapulco, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 2014;30(2):143-6.
136. Thongrunkiat 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.* 2012;43(5):1146-52.
137. 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.* 2008;127(4):395-7.
138. Rosen L. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1988;39(1):123-6.
139. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1998;58(5):578-86.
140. 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.* 2015;52(2):129-33.
141. 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.* 2010;10(10):1017-25.
142. Thangamani S, Huang J, Hart CE, Guzman H, Tesh RB. Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2016;95(5):1169-73.

143. Marquetti Mdel C, Suárez S, Bisset J, Leyva M. [Report of habitats used by *Aedes aegypti* in Havana City, Cuba]. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57(2):159-61.
144. Marquetti FMC, Pérez CM, Mendizábal AME, al. e. Interspecific relationship between *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Culicidae species in Havana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2015;67(2):279-92.
145. 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. *Journal of clinical microbiology.* 1992;30(3):545-51.
146. Sanger Sequencer User Guide, In: Québec's MUaG, editor. 2016.
147. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876-82.
148. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38(7):3022-7.
149. Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ, Barbagallo CB. Preparation of PCR products for DNA sequencing. *Biotechniques.* 1998;24(2):314-7.
150. 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. *Tropical medicine & international health: TM & IH.* 2018;23(12):1342-9.
151. Shroyer DA. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990;6(2):312-4.
152. Mitchell CJ, Miller BR. Vertical transmission of dengue viruses by strains of *Aedes albopictus* recently introduced into Brazil. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990;6(2):251-3.
153. Serufo JC, de Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, *et al.* Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos city, State of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1993;88(3):503-4.
154. Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, *et al.* First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. *Medical and veterinary entomology.* 1997;11(4):305-9.
155. Ricas Rezende H, Malta Romano C, Morales Claro I, Santos Caleiro G, Cerdeira Sabino E, Felix AC, *et al.* First report of *Aedes albopictus* infected by

- Dengue and Zika virus in a rural outbreak in Brazil. *PloS one*. 2020;15(3):e0229847.
156. Correa-Morales F, González-Acosta C, Mejía-Zúñiga D, Huerta H, Pérez-Rentería C, Vazquez-Pichardo M, *et al.* Surveillance for Zika in Mexico: naturally infected mosquitoes in urban and semi-urban areas. *Pathogens and global health*. 2019;113(7):309-14.
 157. Rúa-Urbe GL, Giraldo-Jaramillo TM, Triana-Chávez O, Rojo R, Henao E, Pérez-Pérez J. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes* spp. (Diptera: Culicidae) in Medellín, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 2020;46(1):e6973.
 158. Calderón-Arguedas O, Troyo A, Moreira-Soto RD, Marín R, Taylor L. Dengue viruses in *Aedes albopictus* Skuse from a pineapple plantation in Costa Rica. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*. 2015;40(1):184-6.
 159. Chomposri 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. *Parasites & vectors*. 2016;9:227.
 160. Ferreira-de-Lima VH, Andrade PDS, Thomazelli LM, Marrelli MT, Urbinatti PR, Almeida R, *et al.* Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. *Scientific reports*. 2020;10(1):3855.
 161. Lai Z, Zhou T, Zhou J, Liu S, Xu Y, Gu J, *et al.* Vertical transmission of zika virus in *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2020;14(10):e0008776.
 162. Delatte H, Paupy C, Dehecq JS, Thiria J, Failloux AB, Fontenille D. [*Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control]. *Parasite (Paris, France)*. 2008;15(1):3-13.
 163. Pessanha JE, Caiaffa WT, Cecilio AB, Iani FC, Araujo SC, Nascimento JC, *et al.* Cocirculation of two dengue virus serotypes in individual and pooled samples of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44(1):103-5.
 164. Ngwe Tun MM, Muthugala R, Rajamanthri L, Nabeshima T, Buerano CC, Morita K. Emergence of Genotype I of Dengue Virus Serotype 3 during a Severe Dengue Epidemic in Sri Lanka in 2017. *Japanese journal of infectious diseases*. 2021;74(5):443-9.
 165. Islam A, Abdullah M, Tazeen A, Naqvi IH, Kazim SN, Ahmed A, *et al.* Circulation of dengue virus serotypes in hyperendemic region of New Delhi, India during 2011-2017. *Journal of infection and public health*. 2020;13(12):1912-9.

166. Andrade EH, Figueiredo LB, Vilela AP, Rosa JC, Oliveira JG, Zibaoui HM, *et al.* Spatial-Temporal Co-Circulation of Dengue Virus 1, 2, 3, and 4 Associated with Coinfection Cases in a Hyperendemic Area of Brazil: A 4-Week Survey. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2016;94(5):1080-4.
167. Grunnill M, Boots M. How Important is Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *Journal of medical entomology.* 2016;53(1):1-19.
168. Marquetti MdC, Bisset J, Leyva M, García A, Rodríguez M. Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2008;60.
169. Ayllón T, Câmara DCP, Morone FC, Gonçalves LDS, Saito Monteiro de Barros F, Brasil P, *et al.* Dispersion and oviposition of *Aedes albopictus* in a Brazilian slum: Initial evidence of Asian tiger mosquito domiciliation in urban environments. *PloS one.* 2018;13(4):e0195014.
170. Day JF. Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects.* 2016;7(4).
171. Muturi EJ, Buckner E, Bara J. Superinfection interference between dengue-2 and dengue-4 viruses in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Tropical medicine & international health: TM & IH.* 2017;22(4):399-406.
172. Pepin KM, Lambeth K, Hanley KA. Asymmetric competitive suppression between strains of dengue virus. *BMC Microbiol.* 2008;8:28.
173. Muturi EJ, Bara J. Sindbis virus interferes with dengue 4 virus replication and its potential transmission by *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors.* 2015;8:65.
174. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB. Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS neglected tropical diseases.* 2010;4(6):e706.
175. Grange L, Simon-Lorriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Front Immunol.* 2014;5:280.
176. Reiner RC, Jr., Stoddard ST, Scott TW. Socially structured human movement shapes dengue transmission despite the diffusive effect of mosquito dispersal. *Epidemics.* 2014;6:30-6.
177. Balingit JC, Carvajal TM, Saito-Obata M, Gamboa M, Nicolasora AD, Sy AK, *et al.* Surveillance of dengue virus in individual *Aedes aegypti* mosquitoes collected concurrently with suspected human cases in Tarlac City, Philippines. *Parasites & vectors.* 2020;13(1):594.

178. Chung YK, Pang FY. Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2002;7(4):322-30.
179. Honório NA, Wiggins K, Eastmond B, Câmara DCP, Alto BW. Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida *Aedes albopictus* Populations. *Viruses*. 2019;11(4).
180. Whitehorn J, Kien DT, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrillos PP, Carrington LB, *et al.* Comparative Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to Dengue Virus Infection After Feeding on Blood of Viremic Humans: Implications for Public Health. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(8):1182-90.
181. Lequime S, Paul RE, Lambrechts L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2016;12(5):e1005548.
182. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*. 2011;27(3):111-4.
183. Sanchez-Vargas I, Olson KE, Black WC. The Genetic Basis for Salivary Gland Barriers to Arboviral Transmission. *Insects*. 2021;12(1).
184. Sasaki T, Moi ML, Saito K, Isawa H, Takasaki T, Sawabe K. *Aedes albopictus* Strain and Dengue Virus Serotype in the Dengue Fever Outbreaks in Japan: Implications of Wolbachia Infection. *Japanese journal of infectious diseases*. 2022;75(2):140-3.
185. Wei Y, Wang J, Wei YH, Song Z, Hu K, Chen Y, *et al.* Vector Competence for DENV-2 Among *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;11:649975.
186. Van de Peer Y, Baldauf SL, Doolittle WF, Meyer A. An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. *Journal of molecular evolution*. 2000;51(6):565-76.
187. Guzmán MG, Kourí G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious diseases*. 2002;2(1):33-42.
188. Peláez O, Guzmán MG, Kourí G, Pérez R, San Martín JL, Vázquez S, *et al.* Dengue 3 epidemic, Havana, 2001. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(4):719-22.
189. Rodríguez-Roche R, Blanc H, Bordería AV, Díaz G, Henningsson R, Gonzalez D, *et al.* Increasing Clinical Severity during a Dengue Virus Type 3 Cuban Epidemic: Deep Sequencing of Evolving Viral Populations. *J Virol*. 2016;90(9):4320-33.
190. Rodríguez-Roche R, Alvarez M, Holmes EC, Bernardo L, Kouri G, Gould EA, *et al.* Dengue virus type 3, Cuba, 2000-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(5):773-4.

191. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* 1997;78 (Pt 9):2279-84.
192. Forshey BM, Morrison AC, Cruz C, Rocha C, Vilcarromero S, Guevara C, *et al.* Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(11):1815-8.
193. Nogueira RM, Eppinghaus AL. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2011;106(3):255-6.
194. Vicente-Santos A, Moreira-Soto A, Soto-Garita C, Chaverri LG, Chaves A, Drexler JF, *et al.* Neotropical bats that co-habit with humans function as dead-end hosts for dengue virus. *PLoS neglected tropical diseases.* 2017;11(5):e0005537.
195. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 1983;25(1):53-4.
196. Domínguez-de-la-Cruz E, Muñoz ML, Hernández-García E, Pérez-Ramírez G, David RE, Navarrete-Espinosa J, *et al.* Dataset on the epidemiology and genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico. *Data in brief.* 2020;32:106077.

8. Anexos

Número de acceso GenBank	País de origen	Genotipo	ID en Análisis filogenético
AY858037	India	I	D3/Indo/2004/I
KC762681	India	I	D3/Indo/MKS/2007/I
KU509279	Filipinas	I	D3/Phil/2008/I
AY776329	Taiwán	I	D3/Taiw/2004/I
AY744677	Polinesia Francesa	I	D3/FrencPol/DSS/1989/I
JQ920479	Polinesia Francesa	I	D3/FrencPol/1996/I
FJ898456	Samoa	I	D3/Samoa/1995/I
JQ920483	Nueva Caledonia	I	D3/NwCal/1995/I
AF317645	China	I	D3/Chin/2000/I
MF004386	Malawi	I	D3/Mala/2012/I
AB214879	Timor Lecter	I	D3/Timo/2005/I
KU509280	Tailandia	II	D3/Th/2011/II
MH888332	Tailandia	II	D3/Th/2012/II
KY670634	Vietnam	II	D3/Viet/1998/II
EU482462	Vietnam	II	D3/Viet/2007/II
FJ461322	Vietnam	II	D3/Viet/2008/II
JQ045689	Vietnam	II	D3/Viet/2011/II
MF682971	China	II	D3/Chin/2013/II
GU131903	Cambodia	II	D3/Cambo/2008/II
KY849761	Laos	II	D3/Laos/2010/II
KU509283	Sri Lanka	III	D3/SriLank/2009/III
KU509281	India	III	D3/Indi/2009/III
MH822957	India	III	D3/Indi/2013/III
LC410193	Tailandia	III	D3/Th/2016/III
KF041258	Pakistán	III	D3/Paki/2009/III
KU509282	Senegal	III	D3/Sen/2009/III
KJ830751	Arabia Saudita	III	D3/SaudArab/2014/III
JF808121	Brasil	III	D3/BR/2007/III
JF808120	Brasil	III	D3/BR/2009/III
EU529683	Venezuela	III	D3/VE/2007/III
KF955456	Puerto Rico	III	D3/US/PR/2006/III
HM631861	Nicaragua	III	D3/NI/2009/III
JF920405	Nicaragua	III	D3/NI/2010/III
GU131954	Colombia	III	D3/COL/2006/III
FJ898445	Colombia	III	D3/COL/2007/III
MH544649	Colombia	III	D3/COL/2015/III
MH544650	Colombia	III	D3/COL/2015/III
FJ898442	México	III	D3/MX/2007/III
HQ235027	Paraguay	III	D3/PAR/2007/III
KJ189288	Perú	III	D3/PERU/2008/III
KJ189292	Perú	III	D3/PERU/2009/III
KT726340	Cuba	III	D3/Cub/2001/III
KT726343	Cuba	III	D3/Cub/2001/III
KT726345	Cuba	III	D3/Cub/2002/III
KU509278	Barbados	III	D3/Barb/2007/III
MH888333	Bolivia	III	D3/BOL/2011/III

Número de acceso GenBank	País de origen	Genotipo	ID en Análisis filogenético
AF289029	China	I	D4/Chin/2000/I
AY618992	Tailandia	I	D4/Th/2001/I
AY947539	Filipinas	I	D4/Phi/1956/I
EU127899	Brasil	I	D4/BR/2005/I
EU127900	Brasil	I	D4/BR/2005/I
JN638570	Cambodia	I	D4/Camb/DF/2008/I
JN638571	Cambodia	I	D4/Camb/DHF/2008/I
JN638572	Cambodia	I	D4/Camb/DSS/2008/I
JQ513345	Brasil	I	D4/BR/2011/I
JQ922560	India	I	D4/Indi/2009/I
KF041260	Pakistán	I	D4/Pak/2009/I
KF955510	Cambodia	I	D4/Camb/2002/I
KR922405	Tailandia	I	D4/Th/2011/I
KX224312	Singapur	I	D4/Sing/2014/I
KY672960	China	I	D4/Chin/2015/I
LC410196	Tailandia	I	D4/Th/2016/I
LC410203	Tailandia	I	D4/Th/2017/I
MG053170	India	I	D4/Indi/2016/I
MG601754	China	I	D4/Chin/2013/I
MK614088	China	I	D4/Chin/2019/I
MK614093	China	I	D4/Chin/2018/I
MN711809	México	I	D4/MX/VER/2009/I
EU854301	Venezuela	II	D4/VE/2007/II
FJ182016	Venezuela	II	D4/VE/2007/II
FJ882581	Venezuela	II	D4/VE/2007/II
FJ882592	Venezuela	II	D4/VE/2008/II
GQ199876	Venezuela	II	D4/VE/2007/II
GQ199881	Puerto Rico	II	D4/US/PR/1996/II
HQ332176	Venezuela	II	D4/VE/2007/II
JN092557	Brasil	II	D4/BR/2011/II
KY461772_	Costa Rica	II	D4/CR/2012/II
KJ534635	Costa Rica	II	D4/CR/2012/II
JN559741	Brasil	II	D4/BR/2010/II
JN819406	Venezuela	II	D4/VE/2006/II
JQ513340	Brasil	II	D4/BR/2010/II
JX024757	Singapur	II	D4/Sin/2010/II
AY618993	Tailandia	IIA	D4/Th/2000/IIA
AY776330	Taiwán	IIA	D4/Taiw/2004/IIA
GQ398256	Singapur	IIA	D4/Sing/2005/IIA
JQ822247	China	IIA	D4/Chin/2010/IIA
JQ915083	Polinesia Francesa	IIA	D4/FrenPol/2009/IIA
JQ915085	Nueva Caledonia	IIA	D4/NewCal/2008/IIA
JQ915088	Nueva Caledonia	IIA	D4/NewCal/2009/IIA
KC333651	China	IIA	D4/Chin/GZ/2012/IIA
KC762695	India	IIA	D4/Ind/2007/IIA
KC762696	India	IIA	D4/Ind/2007/IIA
KC762698	India	IIA	D4/Ind/2007/IIA
JF741967	China	IIIA	D4/Chin/2010/IIA
JF262779	Malasia	Selvático	D4/Mal/1975/Syl

JF262780	Malasia	Selvático	D4/Mal/1973/Syl
EF457906	Malasia	Selvático	D4/Mal/1975/Syl