

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

TÍTULO DE LA TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE
LOS VIRUS ZIKA Y DENGUE OBTENIDAS DE
MOSQUITOS AEDES AEDGYPTI**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

SAMANTHA SOLÍS VIDAL

DIRECTOR

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, enero, 2022

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Secretario: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Vocal: Dr. Jesús Miguel Torres Flores,
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dra. Claudia Selene Zárate Guerra
Universidad Autónoma de la
Ciudad de México

Índice

1. Índice general	3
-1.1 Índice de figuras.....	5
-1.2 Índice de tablas	6
-1.3 Abreviaturas.....	7
2. Agradecimientos.....	10
3. Resumen	11
4. Introducción.....	13
-4.1 Epidemiología.....	13
-4.2 Transmisión de arbovirus.....	13
-4.3 Morfología viral	16
-4.4 Genomas virales y clasificación.....	16
4.5.1 Clasificación.....	16
4.5.2 Genes y proteínas	17
-4.5 Replicación del virus.....	20
-4.6 Regiones no codificantes UTRs.....	21
-4.7 Respuesta antiviral.....	23
• 4.7.1 Mosquito	23
• 4.7.2 Humanos/Primates no humanos	24
-4.8 Interacciones proteína-proteína.....	24
4.8.1 Modificaciones postraduccionales en las proteínas virales.....	25
-4.9 Enfermedades.....	26
• 4.10.1 Enfermedades causadas por dengue.....	26
• 4.10.2 Enfermedades causadas por zika	28
5. Antecedentes particulares.....	29
-5.1 Tasa de mutación	30
5.1.1 RNA polimerasa	30
5.1.2 Cuellos de botella.....	33
5.1.3 Procesos de selección positiva.....	34
5.1.4 Procesos de selección negativa	35
5.1.5 Evolución de arbovirus	37
5.1.6 Competencia vectorial.....	38

5.1.7 Evolución del virus del dengue.....	39
5.1.8 Evolución del virus del zika.....	40
6. Hipótesis	42
7. Justificación	42
8. Objetivos	43
-8.1 Objetivos generales	43
-8.2 Objetivos particulares	43
9. Estrategia Experimental.....	44
10. Metodología	45
-10. 1 Muestras.....	45
-10.2 Extracción de RNA	45
-10. 3 Depleción de RNAr.....	46
-10.4 Secuenciación	47
-10. 5 Análisis de variabilidad de genomas.....	49
-10. 6 Análisis filodinámicos	50
11. Resultados	51
-11.1 Obtención de RNA para secuenciación	51
-11.2 Detección de arbovirus	53
-11. 3 Obtención de secuencias	54
-11.4 Ensamblés	55
-11. 5 Genotipificación	56
-11. 6 Análisis de variabilidad.....	58
-11. 7 Análisis filodinámicos	65
12. Discusión	68
13. Conclusiones y perspectivas	72
14. Referencias.....	74
15. Anexos	86

Índice de figuras

Fig. 1. Distribución global de arbovirus durante 2019.

Fig. 2 Ciclo de transmisión de la infección por ZIKV.

Fig. 3. Ciclo de vida del arbovirus en mosquitos.

Fig. 4. Partícula viral del dengue.

Fig. 5 Arquitectura del ARN genómico del virus del Zika, traducción y escisión de la poliproteína.

Fig. 6. Localización de la poliproteína en retículo endoplasmático y citoplasma.

Fig. 7 Complejo replicativo y ensamble del genoma viral en dengue.

Fig. 8. Regiones UTR no codificantes y síntesis de RNAsf.

Figura 9. Interacciones proteína-proteína.

Figura 10. Estrategia experimental.

Figura 11. Gráfica 1. análisis de variación en secuencias de nucleótidos de DENV2 genotipo asiático-americano.

Figura 12. Gráfica 2. Análisis de variación en secuencias de aminoácidos de DENV2 genotipo asiático-americano.

Figura 13. Gráfica 3. Análisis comparativo entre secuencias obtenidas a partir de humanos y mosquitos en DENV2 asiático-americano.

Figura 14. Gráfica 4. Análisis de variación en secuencias de nucleótidos de zika linaje asiático-americano.

Figura 15. Gráfica 5. Análisis de variación en secuencias de aminoácidos de zika linaje asiático-americano.

Figura 16. Gráfica 6. Análisis comparativo entre secuencias obtenidas a partir de humanos y mosquitos en zika linaje asiático-americano.

Figura 17. Análisis filodinámico de secuencias de DENV2 genotipo asiático-americano.

Figura 18. Análisis filodinámico de secuencias de zika linaje asiático-americano.

Índice de tablas.

Tabla 1. Las funciones más importantes de las proteínas virales y su localización.

Tabla 2. Clasificación modificada de la gravedad del dengue.

Tabla 3. Genomas de referencia.

Tabla 4. Características de las muestras de sueros humano con los valores de CT.

Tabla 5. Pools positivos arbovirus 2017.

Tabla 6. Muestras positivas para arbovirus 2021.

Tabla 7. Muestras enviadas a RNAseq.

Tabla 8. Características demográficas y síntomas de los pacientes.

Tabla 9. Características de los ensambles.

Tabla 10. Distribución comparativa de SNV significativos en secuencias de DENV2 genotipo asiático-americano obtenidas de humanos y mosquitos.

Tabla 11. Aminoácidos diferenciales entre los grupos de secuencias de mosquitos y los de humano de DENV2 genotipo asiático-americano.

Tabla 12. Tabla de distribución comparativa de SNV significativos en secuencias de ZIKV linaje asiático-americano obtenidas de humanos y mosquitos.

Tabla 13. Aminoácidos diferenciales entre los grupos de secuencias de mosquitos y los de humano de ZIKV linaje asiático-americano.

Abreviaturas.

Cas9: proteína 9 asociada a CRISPR

CENAPRECE: Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades.

C3: complemento 3

C5: complemento 5

CH3: metil

CHIKV: virus chikungunya

CRISPR: repeticiones palindrômicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.

DC-SIGN: células dendríticas específicas

DENV: virus del dengue

DGE: Dirección General de Epidemiología

DI: defectuosas interferentes

dN: sustituciones no sinónimas

dS: sustituciones sinónimas

FC γ R: receptor FC gamma

GTPasa: guanosina trifosfatasa

IL-8: interleucina ocho

IL-6: interleucina seis

IFN α/β : interferón alfa/beta

LRR: proteínas ricas en leucinas

MDA5: proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma

miRNA: micro ácido ribonucleico

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NF $\kappa\beta$: factor nuclear kappa/beta

NS: no estructural

NTPasa: nucleótido de trifosfatasa

OMS: Organización Mundial de Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PRR: receptor de reconocimiento de patrones
RIG-1: gen inducible de ácido retinoico 1
RNA: ácido ribonucleico
RNAi: ácido ribonucleico de interferencia
RNAsf: ácido ribonucleico subgenómico de *flavivirus*
RNAnc: ácido ribonucleico no codificante
SNV: variantes de un solo nucleótido
SUMO: pequeñas ubiquitinas relacionadas
TLR3: receptor tipo Toll 3
TLR7: receptor tipo Toll 7
TAM: familia Tyro3, Axl y Mertk
TIM: dominio de mucina
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
VSV: virus de estomatitis vesicular.
WNV: virus del Nilo Occidental
ZIKV: virus del zika



“Con amor para mis hijos uno en el cielo y otro en mi vientre... uno me dio el motivo para iniciar esta maestría y otro la fuerza para terminarla, siempre en mi corazón”

Agradecimientos:

- Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología por el otorgamiento de la beca 1007158 para realizar la maestría y el financiamiento 30297 para la parte de metodología.
- Mi directora de tesis la Dra. Claudia Selene Zárate Guerra, por su enseñanza y dirección en todo momento.
- A los doctores Martha E. Yocupicio Monroy y Jesús M Torres Flores, por su asesoría y conocimientos para llevar a cabo este proyecto.
- A todos los doctores del posgrado en ciencias genómicas de la UACM por los conocimientos transmitidos durante mi estancia, en especial a los doctores Lilia, Minerva, Elisa, Olga, Máximo y Mauricio.
- A las Licenciadas Caty y Danna por su constante motivación y asistencia en todos los trámites del posgrado.
- A mis compañeros Selene, José, Omar, Caballero y Anahí por el acompañamiento durante mi estancia y su apoyo y a mi amigo Santiago Bautista.
- Por último, a mi abuelito Chucho Vidal, mis familias Solís Vidal, Ross Solís y Dios al ser una fuerza impulsora importante en este camino.



Resumen.

Introducción. El DENV y ZIKV son virus del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* involucrados en enfermedades emergentes y reemergentes. El vector es un artrópodo que transmite el virus de vertebrado a otro por picadura. Estos virus poseen un genoma de RNA lo cual permite una gran variabilidad genética, las variantes generadas a través de rondas de replicación están sujetas a mecanismo evolutivos y pueden cambiar con el paso de un hospedero a otro. Los estudios de variación genética se han centrado en secuencias virales obtenidas de humanos y mosquitos infectados artificialmente, por lo que el estudio en poblaciones silvestre de mosquito permitirán una mejor comprensión. El objetivo de nuestro trabajo fue la caracterización de las secuencias de *Flavivirus* (DENV y ZIKV) obtenidas de mosquitos y humanos, determinar su relación filogenética y el análisis de variación genética.

Materiales y métodos. Se obtuvieron muestra de mosquito adultos y de pacientes con diagnóstico de síndrome febril en 2016. Se les realizó detección de arbovirus mediante rt-qPCR, a las muestras positivas se realizó extracción de RNA ribosomal y cuantificación de RNA, posteriormente se realizó RNAseq, ensamble de novo y referencia para la determinación de las secuencias de *flavivirus* y su genotipificación; se realizaron análisis filodinámicos y de variabilidad de genomas intra-hospedero.

Resultados. Se detectaron 20 muestras de mosquito y 4 de humano positivas arbovirus, se seleccionaron 13 para secuenciación. Reconstruimos una secuencia de DENV4 genotipo II. Se realizó la reconstrucción de dos árboles filodinámicos uno de DENV2 genotipo asiático-americano y otro de ZIKV linaje asiático-americano. Los análisis de variación permitieron identificar un mayor número de variación en las proteínas NS2A y péptido 2K en DENV2 genotipo asiático-americano y en C, NS2A, NS2B y NS3 en ZIKV linaje asiático-americano.

Conclusiones. Los análisis de variación de las secuencias nos permitieron identificar un mayor número de variación en las proteínas no estructurales involucradas en la formación del complejo replicativo, corte de proteasas, ensamble del virión y respuesta inmune, además la acumulación de variación se observó más en las secuencias de DENV2 y se correlaciona con una mayor ganancia de variantes observada en la filogenia en contraste con las secuencias de ZIKV donde fue menor.

Abstract.

Introduction. DENV and ZIKV are viruses of the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family involved in emerging and reemerging diseases. The vector is an arthropod that transmits the virus from vertebrate to another by bite. These viruses have an RNA genome which allows for a large genetic pool, the variants produced through rounds of replication are subject to an evolutionary mechanism and can change from one host to another. Genetic variation studies have focused on viral sequences obtained from humans and artificially eliminated mosquitoes, so the study of wild populations of mosquitoes will allow a better understanding. The objective of our work was the characterization of Flavivirus (DENV and ZIKV) sequences obtained from mosquitoes and humans, to determine their phylogenetic relationship and the analysis of genetic variation.

Materials and methods. Samples were taken from adult mosquitoes and from patients diagnosed with febrile syndrome in 2016. Arbovirus detection was performed using rt-qPCR, ribosomal RNA extraction and RNA quantification were performed on positive samples, subsequently RNAseq was performed, assembly de novo and reference for the determination of flavivirus sequences and their genotyping; Phylodynamic and selection analyzes of intra-host genomes were performed.

Results. 20 mosquito and 4 human arbovirus positive samples were detected, 13 were selected for sequencing. We reconstructed a sequence of DENV4 genotype II. Reconstruction of two phylodynamic trees, one from DENV2 Asian-American genotype and the other from ZIKV Asian-American lineage, was performed. The variation analyzes allowed to identify a greater number of variation in the NS2A proteins and 2K peptide in DENV2 Asian-American genotype and in C, NS2A, NS2B and NS3 in ZIKV Asian-American lineage.

Conclusions. Sequence variation analyzes allowed us to identify a greater number of variations in non-structural proteins involved in the formation of the replicative complex, protease cleavage, virion assembly, and immune response; furthermore, the accumulation of variation will be more modified in the sequences of DENV2 and correlates with a higher gain of variants observed in the phylogeny in contrast to the ZIKV sequences where it was lower.

INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son virus transmitidos por artrópodos hematófagos a un hospedero vertebrado. Dentro de los más importantes por el número de casos que se producen en nuestro país se encuentran los virus del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Musso, 2016).

El género *Flavivirus* agrupa varios virus relevantes para la salud pública a nivel mundial, pues son causantes de enfermedades emergentes y reemergentes (Filomatori, 2017) como Dengue, Zika, Chikunguña, Fiebre Amarilla y los virus del Nilo Occidental.

Epidemiología.

Como se mencionó anteriormente existen dos virus de importancia epidemiológica en México, el virus del dengue (DENV) y el virus de Zika (ZIKV). En el año 2021 la Dirección General de Epidemiología (DGE) confirmó un total de 170,597 casos de dengue y se han reportado 20,729 casos de Zika en el periodo de 2015-2021 (DGE).

El ZIKV fue aislado por primera vez en Uganda en 1947 en un mono macaco Rhesus febril. La infección en humanos se documentó en 1954 en Nigeria (Musso; 2016). Fuera de África el primer brote ocurrió en Micronesia en 2007 y en 2014 ocurrió un brote en Brasil que se extendió por todo el continente americano, a finales de enero se había expandido a más de 20 países.

Por otro lado, el registro más antiguo de dengue se fue encontrado en una enciclopedia médica China de 992 a.C. mientras que los brotes en América se han presentado desde los años 1600 (Boccolini, 2016). En el continente americano la infección por DENV presenta un patrón endo-epidémico con brotes cada tres a cinco años que, dependerán del serotipo circulante y la distribución del vector (Dick, 2012). En el periodo comprendido entre 2011 a 2017 aumento 30% el número de casos de dengue, en comparación con lo reportado para 2001 a 2010 (Salles, 2018). Siendo la enfermedad transmitida por artrópodos más prevalente en todo el mundo, con 390 millones de casos reportados anualmente (Filomatori, 2017).

Transmisión de arbovirus

Los vectores de arbovirus se caracterizan por ser artrópodos que transmiten el virus de un vertebrado a otro por picadura. En el caso de DENV y ZIKV los vectores son los mosquitos hematógos de la familia *Culicidae* ; en el caso de ZIKV es el mosquito hembra del género *Aedes* sp.: *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* las especies más comunes las cuales comparte con DENV; adicionalmente se ha detectado en otras especies de *Aedes* como *Aedes africanus*, *Aedes hensilli* y en el mosquito *Culex quinquefasciatus* (Boccolini, 2016). En las últimas décadas la distribución de los arbovirus se ha extendido en gran parte del planeta, no solo para DENV y ZIKV, sino también para chikungunya (CHIKV) el cual es un *alfavirus*, de la familia *Togaviridae* y virus del Nilo Occidental (WNV) que pertenece a la familia de los *Flaviviridae* (Fig. 1) (Wu, 2019). Los mecanismos empleados para su propagación dependen de las interacciones entre el virus, vector y hospedero.

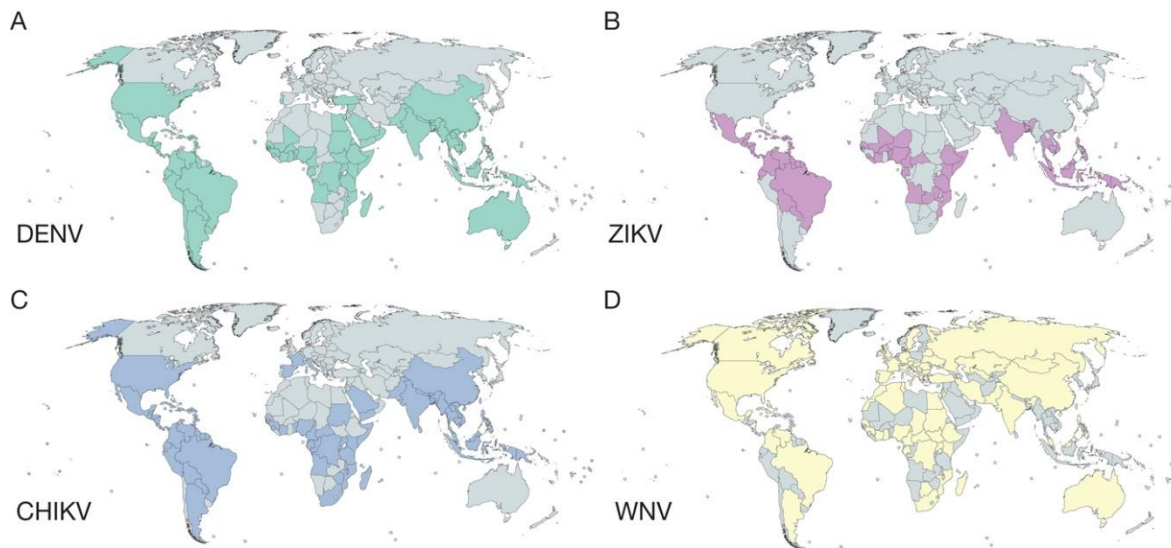


Fig. 1. Distribución global de arbovirus durante 2019. A) Dengue, B) Zika, C) Chicungunya, D) Virus del Nilo Occidental. Imagen tomada y modificada de *W*,; 2019.

Dentro de los mecanismos de transmisión para ambos virus tenemos el de vía de transmisión horizontal (*Lequime, 2016; Musso, 2016*), donde la infección se propaga de un mosquito infectado a un vertebrado, de este a otro mosquito y nuevamente un vertebrado. Además, se ha reportado la ocurrencia de transmisión vertical (transovárica) de mosquitos hembra infectados a su descendencia, lo cual puede ser un mecanismo importante en el mantenimiento del virus en la población de mosquitos durante los periodos inter-epidémicos (*Izquierdo-Suzán, 2019*), además se ha reportado que ZIKV se puede transmitir verticalmente de madre a feto (vía perinatal), nosocomial, por trasplante de órganos, vía sexual, perinatal y transfusional esta última la puede llegar a compartir con DENV.

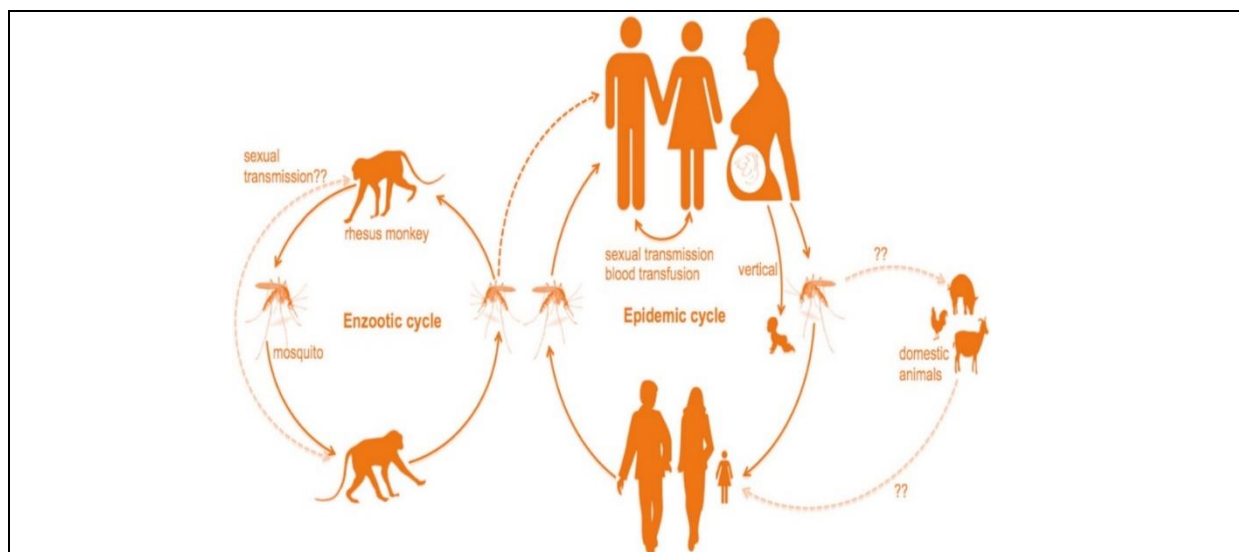


Fig. 2 Ciclo de transmisión de la infección por ZIKV. Imagen tomada y modificada de *Pielnaa et al, 2020*.

Dentro de los ciclos de transmisión se encuentra el enzoótico o selvático, el cual se da entre primates no humanos y mosquitos en el hábitat selvático y el urbano o epidémico donde la transmisión es entre mosquitos y humanos (Fig. 2) (Boccolini, 2016).

Cuando el mosquito pica a un vertebrado virémico, el virus traspasa barreras físicas e inmunitarias del mosquito (proceso de adquisición), para poder establecer la infección en células de tejido epitelial en el intestino medio. Las primeras 24 a 48 h posteriores a la ingestión del virus, la carga viral disminuye a medida que el intestino medio se infecta y las barreras para detener la infección se establecen, la diseminación del virus ocurre durante el tercer día de exposición (Adquisición) (Kang, 2018). Dentro de los mecanismos de inmunidad implicados en el desarrollo de la infección tenemos la inmunidad intestinal relacionada con la activación de vías de transducción como la Toll y Jak, mecanismos de RNA de interferencia (RNAi), la microbiota del mosquito y componentes de su sangre como la inmunoglobulina M, entre otras; después de un periodo de incubación extrínseco, el virus se disemina por la hemolinfa, pudiéndose detectar partículas virales en las glándulas salivales, ovarios y sistema neural, en un nuevo evento de alimentación el mosquito ya es competente para transmitir la infección de un nuevo hospedero vertebrado (Transmisión) (Lequime, 2016; Sim, 2015; Wu, 2019) Figura 3.

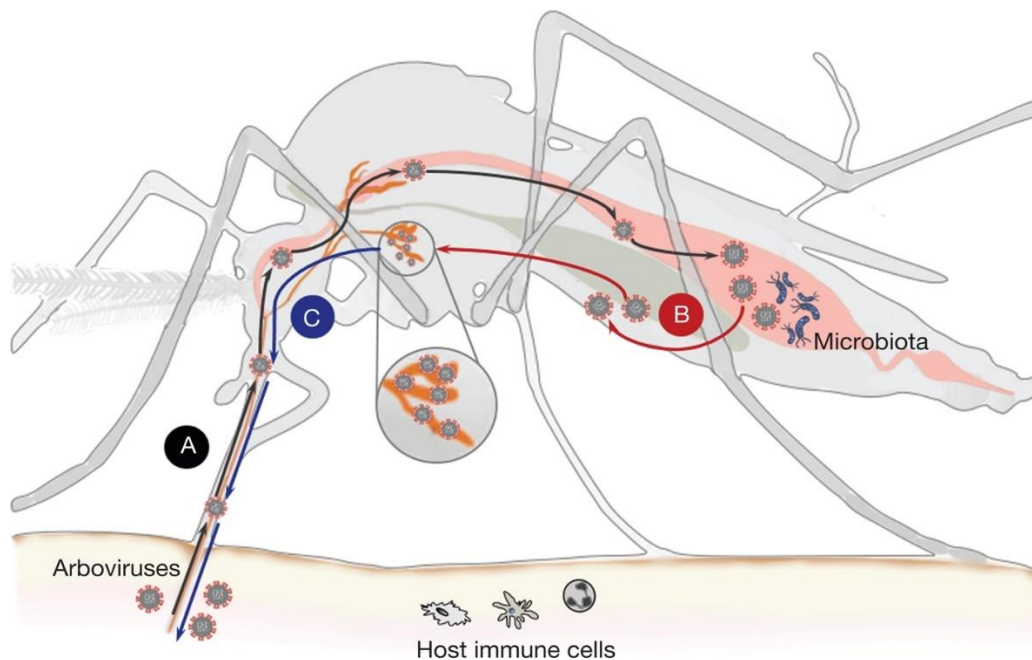


Fig. 3. Ciclo de vida de los arbovirus en mosquitos. A) Adquisición, B) Diseminación y C) Transmisión. Imagen tomada y modificada de Wu, 2019.

Morfología viral.

DENV y ZIKV presentan un tamaño de 50 nm, simetría icosaédrica, la proteína E se asocia a la superficie de la membrana, mientras que la proteína M se aloja debajo de esta; se llegan a insertar hasta 180 copias de ambas proteínas; se forman heterodímeros prM-E ensamblados en 60 espigas, conformados por trímeros de estos (*Kostyuchenko; 2016; Tan, 2020*). Figura 4.

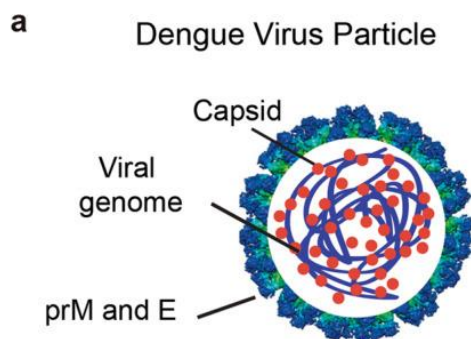


Fig. 4. Partícula viral del dengue. Imagen tomada y modificada de Navarro, 2020.

Genomas virales y clasificación.

Como se mencionó anteriormente, ZIKV y DENV pertenecen a la familia *Flaviviridae*. Los virus de esta familia se caracterizan por tener un genoma de RNA monocatenario de polaridad positiva, con un tamaño que oscila entre los 10.7 Kb y 11 Kb. El genoma de estos virus está flanqueado por dos regiones no codificantes 5'-UTR y 3'-UTR y contiene un marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de 3419 aa, la cual sufre modificaciones co y postraduccionales generando 10 proteínas, de las cuales tres son estructurales y siete no estructurales.

Clasificación.

Con base en las secuencias genómicas el ZIKV se clasifica en tres linajes filogenéticos: África-oriental, África-occidental y Asiático-americano (*Li 2018, Plourde, 2016; Shrivastava, 2018; Sironi, 2016*). El linaje asiático-americano detectado en Malasia se deriva de la migración de África al sudeste asiático, posteriormente se expandió a las islas del Pacífico (*Plourde, 2016*), entre 2013 y 2014 el linaje asiático-americano ingresa al continente americano y se diversifica en 4 sublinajes, A se distribuyó en Suramérica, B en Suramérica y Caribe, C en Centro América y D Norteamérica y el Caribe (*Hu. 2019*). En México el linaje que actualmente circula es el asiático-americano.

DENV se ha clasificado en cuatro serotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, cada uno de los cuales se subdivide en un número diferente de genotipos, que suelen tener una distribución geográfica específica (*Fontaine; 2018*). Esta clasificación del virus en serotipos se originó a partir de la observación de que la respuesta inmune en humanos después de una primera infección protegía de forma total contra infecciones de virus homólogos (del mismo

serotipo) y parcial y transitoriamente contra virus de tipos heterólogos (de otros serotipos). Los análisis filogenéticos han demostrado que estos serotipos son genéticamente divergentes (Katzelnick, 2015).

Entre los serotipos es DENV 2 es el más transmitido en todo el mundo. El cual se divide en 7 genotipos o subtipos: subtipo I (asiático II), subtipo II, subtipo IIIa (asiático I) subtipo IIIb (asiático-americano), subtipo IV (cosmopolita), subtipo V (americano) y genotipo selvático (Mendez, 2012); en México circula el dengue tipo 2 subtipo asiático-americano.

Genes y proteínas.

Las proteínas estructurales de los flavivirus son tres: la proteína de cápside (C), la proteínas de membrana (M), que proviene de la proteína precursora de membrana (prM) y la proteína de envoltura (E). Las proteínas no estructurales (NS) son: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, el péptido K, NS4B y NS5 (Sirohiy, 2017). Estas proteínas se traducen en una poliproteína que posteriormente es procesada por proteasas virales y del hospedero. A continuación, se detallan las características y los procesos involucrados en la generación de cada una de estas proteínas (Figuras 5 y 6).

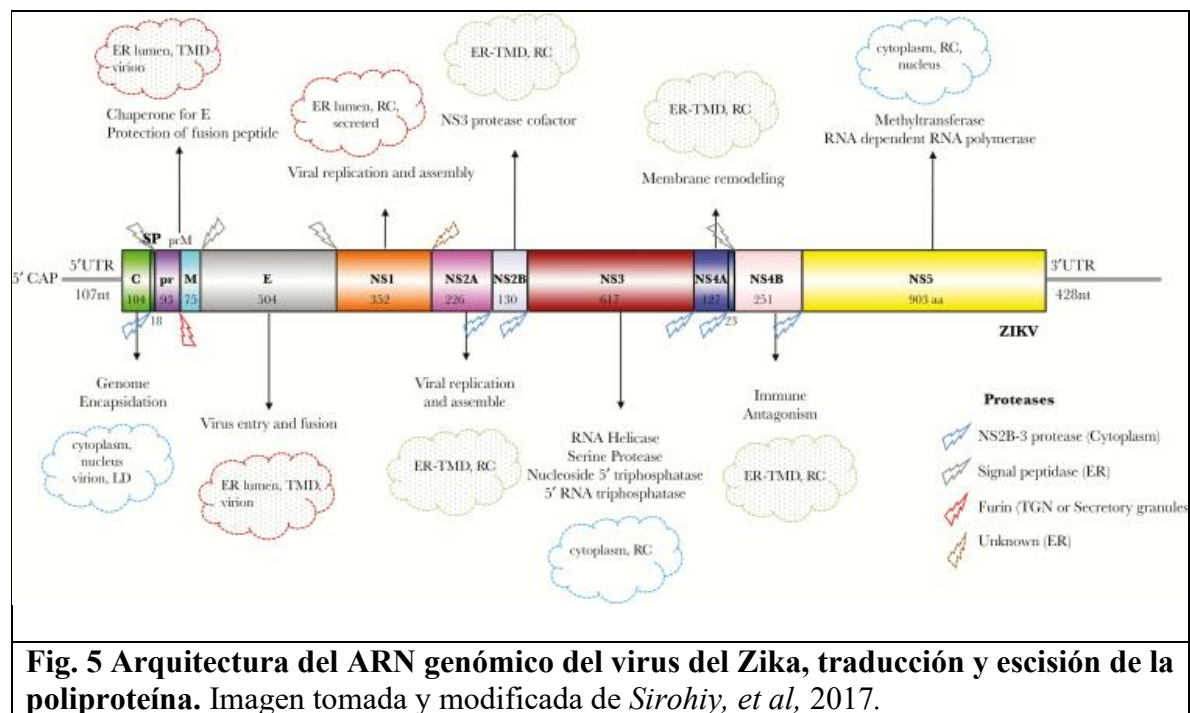


Tabla 1. Las funciones más importantes de las proteínas virales y su localización.

Proteínas	Funciones
Proteína de cápside (C)	proteína de 114 aminoácidos, 342 nucleótidos en dengue y 122 aminoácidos, 366 nucleótidos para zika. Participa en dos procesos importantes la encapsulación del genoma y el desencadenamiento del genoma. La nucleocápside se encuentra formada por el genoma de RNA y múltiples copias de la proteína C. Se encuentra presente en los nucléolos y las gotitas lipídicas, sin embargo, se desconoce su función en estas ubicaciones (<i>Navarro, 2020</i>). Contiene un bucle de carga positiva orientado al extremo amino y 5 alfa hélices, la última de estas es un péptido señal útil para la translocación del péptido prM en la membrana, en la unión de la hélice 4 y 5, la proteasa realiza el corte.
Proteína prM	contiene 166 aminoácidos y 498 nucleótidos en dengue y 168 aminoácidos, 504 nucleótidos en zika, consta de proteínas pr y M, las cuales se asocian con la proteína E para formar la estructura viral, prM será procesada por una proteasa de tipo serina endopeptidasa (subtilisina), para formar al final la partícula madura.
Proteína de membrana (M)	Presenta 75 aminoácidos, 225 nucleótidos tanto para dengue y zika. Posee un ectodominio y dos hélices transmembranales (<i>Panya, 2015</i>), el ectodominio (del aminoácido 1 al 40) está involucrado en el proceso de apoptosis en las células infectadas de dengue, a través de interacciones con las proteínas anti-apoptosis Bcl-2, relacionada con eventos de permeabilización de la membrana mitocondrial (<i>Catteau, 2003; Brabant, 2009</i>).
Proteína de envoltura (E)	Tiene 495 aminoácidos, 1485 nucleótidos y 500 aminoácidos, 1500 nucleótidos en zika, es una glicoproteína presenta 4 dominios, tres ectodominios (I, II, y III) con hojas beta plegadas y un par de dominios tallos-transmembrana, dominio II presenta una secuencia conservada entre todos los <i>flavivirus</i> ; su función principal es facilitar la entrada de la partícula viral mediante el proceso de endocitosis mediada por receptor, los cambios de pH permiten que esta proteína reaccione con el endosoma y así poder inducir la fusión (<i>Modis, 2004; Sirohiy, 2017; Tan, 2020</i>). El dominio III de la proteína, incluye la región de unión al receptor estimula la respuesta inmune del hospedero induciendo anticuerpos y factores neutralizantes (<i>Fahimi, 2018</i>).
NS1	Para dengue y zika presenta 352 aminoácidos y 1056 nucleótidos. Es una glicoproteína, esta puede presentarse como monómero en la membrana, como dímero en superficie de la célula este puede interactuar con NS4A y NS4B durante la infección y es secretada como hexámero a la circulación el cual puede estimular la respuesta del sistema inmune (<i>Norazharuddi, 2018</i>).
NS2A	218 aminoácidos, 654 nucleótidos en dengue y 226 aminoácidos, 678 nucleótidos en zika. Es una proteína hidrofóbica que presenta 8 segmentos transmembranales. Se encarga de promover el reclutamiento del RNA viral, las proteínas (C-prM-E) y proteasas (NS2B-NS3)

	virales al sitio de la replicación y coordina el proceso de formación de la nucleocápside y virión (Xie, 2019). Posee un sitio de unión al extremo 3'UTR el cual se une a un bucle citosólico de NS2A. además de ser importante en el mecanismo de silenciamiento de RNAi.
NS2B	130 aminoácidos y 390 nucleótidos para ambos virus. Proteína hidrofóbica que se presenta como dímero con la proteasa NS3. Posee 4 hélices transmembranales cortas y un dominio central hidrofílico entre la segunda y tercera hélice con 40 residuos altamente conservados, involucrados en la actividad de cofactor (Moreland, 2011; Reddy, 2018).
NS3	618 aminoácidos y 1854 nucleótidos en dengue y para zika tiene un nucleótido menos. Esta proteína presenta funciones importantes que dependen de su estructura; la función como proteasa se encuentra hacia el extremo amino terminal, indispensable para el procesamiento de proteínas virales y del hospedero, tiene una actividad serina proteasa, reconociendo dos sitios con dos residuos catiónicos, actuando de manera conjunta con NS2B; además funciona como nucleósido NTPasa y RNA-trifosfatasa. Por otro lado, la función como helicasa que se encuentra hacia el extremo carboxilo abarca el 70% de la proteína, la cual se ha visto involucrada en el proceso de replicación, esta región posee tres subdominios (Norazharuddin, 2018).
NS4A	127 aminoácidos y 381 nucleótidos para ambos virus. Proteína de membrana hidrofóbica que presenta 6 hélices, induce reorganización del retículo endoplasmático y promueve la localización perinuclear del complejo replicativo, se une a la proteína vimentina para ayudar a estabilizar el complejo replicativo, además induce autofagia como mecanismo de protección viral en las células infectadas (Jing, 2014).
Péptido 2K	23 aminoácidos y 69 nucleótidos en los dos virus. Se desconoce la mayoría de sus funciones, pero se sabe que su secuencia es necesaria para la translocación de NS4B al retículo endoplasmático (actuando como un péptido señal) (Reddy; 2018).
NS4B	248 aminoácidos, 744 nucleótidos en dengue y 251 aminoácidos, 753 nucleótidos. Proteína con 11 hélices, distribuidas entre el retículo endoplasmático y el citoplasma con sitios de glicosilación importantes para la replicación Esta proteína interacciona con el dominio helicasa de NS3 ayudando a disociar a NS3 del RNA viral. Se ha visto relacionada con el inhibición de la vía de señalización interferón (Norazharuddin; 2018; Reddy; 2018)
NS5	900 aminoácidos, 2700 nucleótidos en dengue y 903 aminoácidos, 2709 en zika. Es la proteína más conservada de todas, hacia el dominio amino se presenta una función metiltransferasa y GTPasa, necesarias para la formación de <i>caperuza</i> , su extremo carboxilo tiene la actividad RNA polimerasa dependiente de RNA, responsable de la replicación viral. Presenta también una localización nuclear que es promovida por interacciones con NS3 y tiene la capacidad de inducir la actividad de IL-8, IL-6 y TNF- α (Moon, 2018).

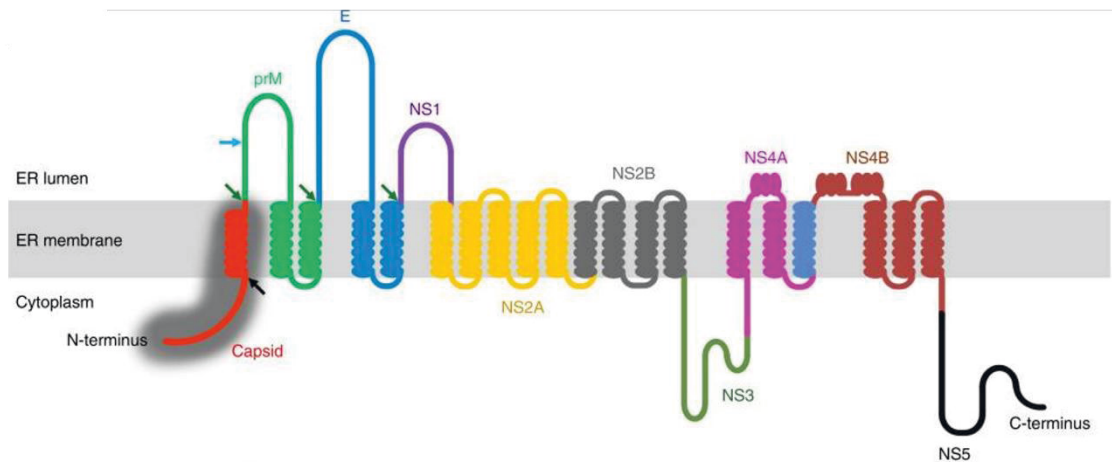


Fig. 6. Localización de la poliproteína en retículo endoplasmático y citoplasma. Imagen tomada y modificada de Tan, 2020.

Replicación viral.

La infección inicia cuando la partícula viral se une al receptor específico del hospedero y permite la entrada de este por endocitosis, posteriormente se da fusión con el endosoma y la liberación del genoma de RNA en el citoplasma para iniciar la traducción de sus proteínas. Aunado a esto se produce un reordenamiento de organelos membranosos para formar los complejos replicativos donde se produce la amplificación del genoma por la RNA polimerasa dependiente de RNA (Navarro, 2020).

El proceso de traducción se lleva a cabo en los ribosomas del hospedero y el RNA se traduce como una sola poliproteína, la cual sufrirá modificaciones co y postraduccionales por medio de proteasas virales y del hospedero, dentro de estas proteasas tenemos el dímero conformado por NS2B-NS3 (Moreland, 2011).

En cuanto al ensamble de la partícula el RNA de polaridad positiva sintetizado interacciona con la proteína C y se fusiona en la cara citoplasmática del retículo endoplasmático con los heterodímeros prM-E, posterior a esto sufre un proceso de gemación en la luz del retículo formando una partícula inmadura de 60 nm, a medida que el virión avanza por el Golgi y la vía secretora, el pH ácido genera el procesamiento de prM y finalmente el virus se libera por exocitosis (Fig. 6) (Kostyuchenko, 2013).

Los receptores de entrada propuestos para dengue son lectinas tipo C, integrinas de agarre específicas de ICAM3 específicas de células dendríticas (DC-SIGN), específicas de hígado/ganglio linfático (L-SING), receptores de manosa, receptores fosfatidilserina de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina (TIM) y el receptor de fosfolípidos CD300. En zika se ha sugerido miembros de la familia TAM (Tyro3, Axl y Mertk), sin embargo, no han sido confirmados y estudios con CRISPR-Cas9 usando células neuronales

deficientes en algunos de estos genes no mostró alteraciones en el proceso de infección (Elong, 2018).

Otro mecanismo propuesto para la entrada a la célula hospedera es mediante la formación de complejos virus-anticuerpos, los cuales se unen al receptor de macrófagos FC γ R en macrófagos, permitiendo la entrada a la célula y su posterior replicación (Halstead, 1988).

El tropismo celular en dengue aún no se establece por completo, sin embargo, las autopsias han mostrado la infección en células del sistema monocito-macrófago, siendo estos los principales hospederos, otros tejidos incluyen a los ganglios linfáticos, hígado, bazo, pulmones, riñones y estómago (Balsitis, 2009). La infección por ZIKV se ha documentado en células neurales, gliales, amnióticas, del mesénquima fetal, células de Hofbauer, astrocitos, fibroblastos, endoteliales, mononucleares, renales, hepáticas, de retina, lo que hace que sea un virus pantrópico (Rosenberg, 2017; Roach, 2017; Liu, 2016).

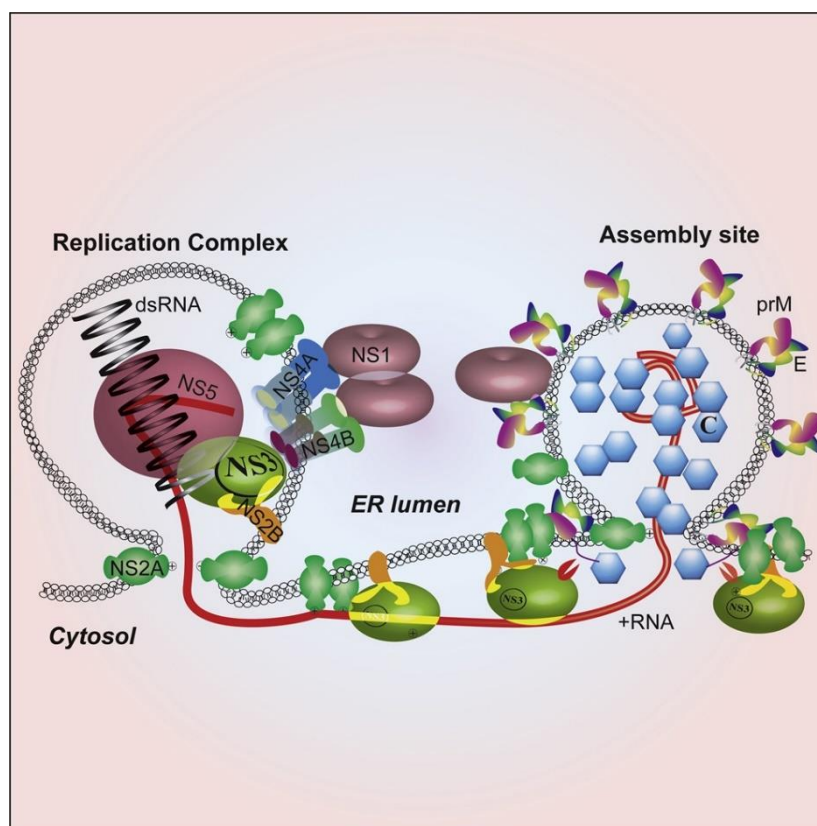


Fig. 7 Complejo replicativo y ensamblaje del genoma viral en dengue. Imagen tomada y modificada de Xie, 2019.

Regiones no codificantes.

Las regiones no codificantes en los flavivirus se caracterizan por tener estructura de tallo-burbuja que son importantes en la regulación de procesos como la replicación y el establecimiento de la infección especialmente el extremo 3'.

El extremo 5'UTR presenta 96 nucleótidos en dengue y 106 en zika presenta una *caperuza* de guanina metilada en N-7 y una ribosa metilada en O-2'. El promotor se encuentra es un tallo-bucle A ubicado en esta región; se une de manera directa a NS5 e inicia la replicación del genoma viral circularizado en el extremo 3'UTR (*Filomatori, 2011*).

El extremo 3'UTR es más largo, incluye aproximadamente 384 nt en ambos virus, en esta región se encuentra dos RNA no codificantes (RNAnc) los cuales modulan la replicación y el proceso de infección en *flavivirus*, uno es un RNA subgenómico de *flavivirus* (RNAsf) y un micro RNA (miRNA) derivado de flavivirus Kun-miR-1 en el virus Kunjin.

El RNAsf se genera a través de la degradación de incompleta del RNA genómico, por medio de una exoribonucleasa-1 (XRN1) en dirección 5'-3' del hospedero. La presencia de tres estructuras tallo-burbuja en el extremo 3' impiden que la degradación por parte de XRN1 y permite la síntesis de los RNAnc (*Clarke, 2015*), figura 6.

Dentro de las funciones de dichos RNAsf se incluyen antagonizar la señal de la respuesta inmune, inhibir de forma directa a Dicer y lo cual permite escapar de la degradación a los RNAmir virales y desestabilizar las homeostasis de los miRNA del hospedero y RNAsf actúa de manera directa con el complejo de replicación viral, para regular su actividad.

Kun-miR-1 se ha relacionado con el proceso de replicación del virus en mosquito, este fue demostrado en 2014 en DENV-2, al interactuar de forma directa con NS1 inhibe la replicación (*Hussain, 2014*).

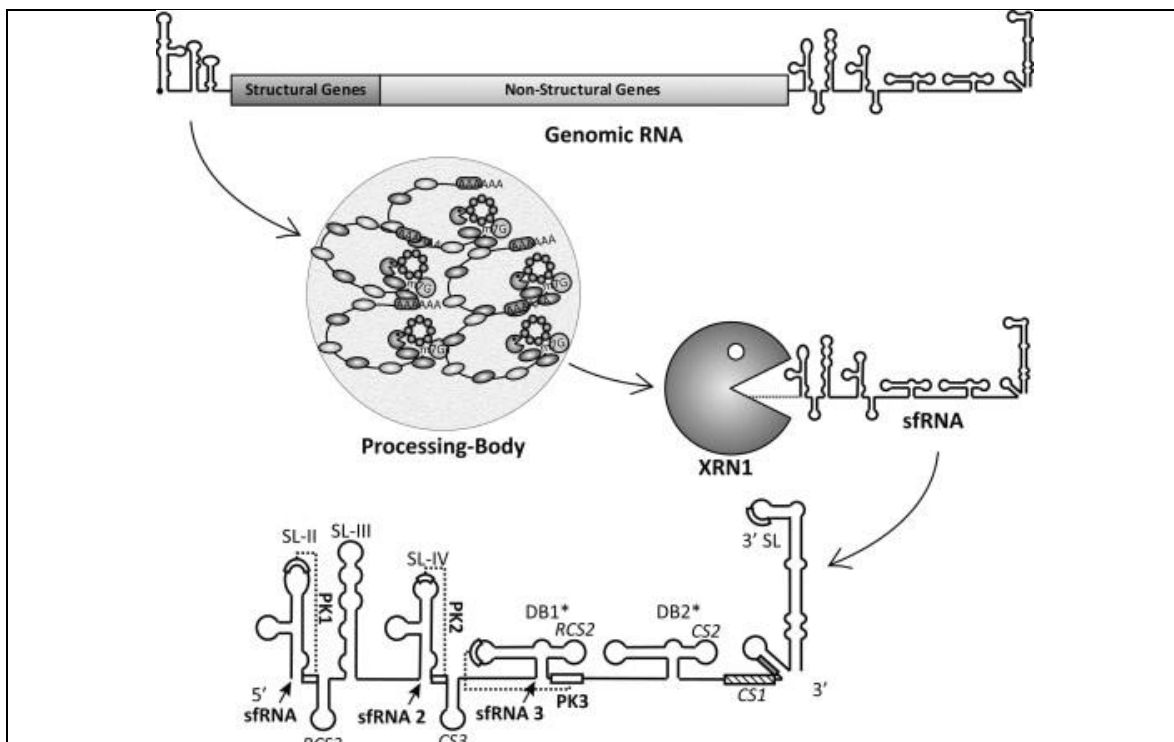


Fig. 8. Regiones UTR no codificantes y síntesis de RNAsf. Imagen tomada y modificada de *Clarke, 2015*.

Respuesta antiviral.

-Mosquitos

En los mosquitos la respuesta inmune se limita al sistema inmune innato, el cual montará una respuesta frente a patógenos encontrados durante la ingestión de sangre, estos producen componentes humorales y celulares como parte de la respuesta (Zhao, 2019).

Algunos genes implicados: péptidos antimicrobianos, defensinas y vías de inmunidad como Toll, Imd, JAK/STAT, proteínas ricas en leucina (LRR) y RNA de interferencia (RNAi), están presentes durante la respuesta a infecciones por arbovirus.

En las infecciones por chikungunya se expresan genes que codifican tripsina, metaloproteasas y endopeptidasas de tipo serina, podrían estar involucrados en barreras de escape del intestino medio en *Ae. aegypti* (Dong, 2017).

Análisis transcriptómicos en líneas celulares Aag2 infectadas con dengue tipo 2, han demostrado un enriquecimiento de vías implicadas en el metabolismo de las pirimidinas, el implicado en el mecanismo de muerte celular programada, la cual se puede inducir en células infectadas; además, de otras vías asociadas a este proceso son la vía de señalización de FoxO, la cual no solo regula la apoptosis, si-no procesos como ciclo celular y longevidad y las vías Toll e Imd involucradas en inmunidad que, se encontraron a la baja (Li, 2020) Figura 9.

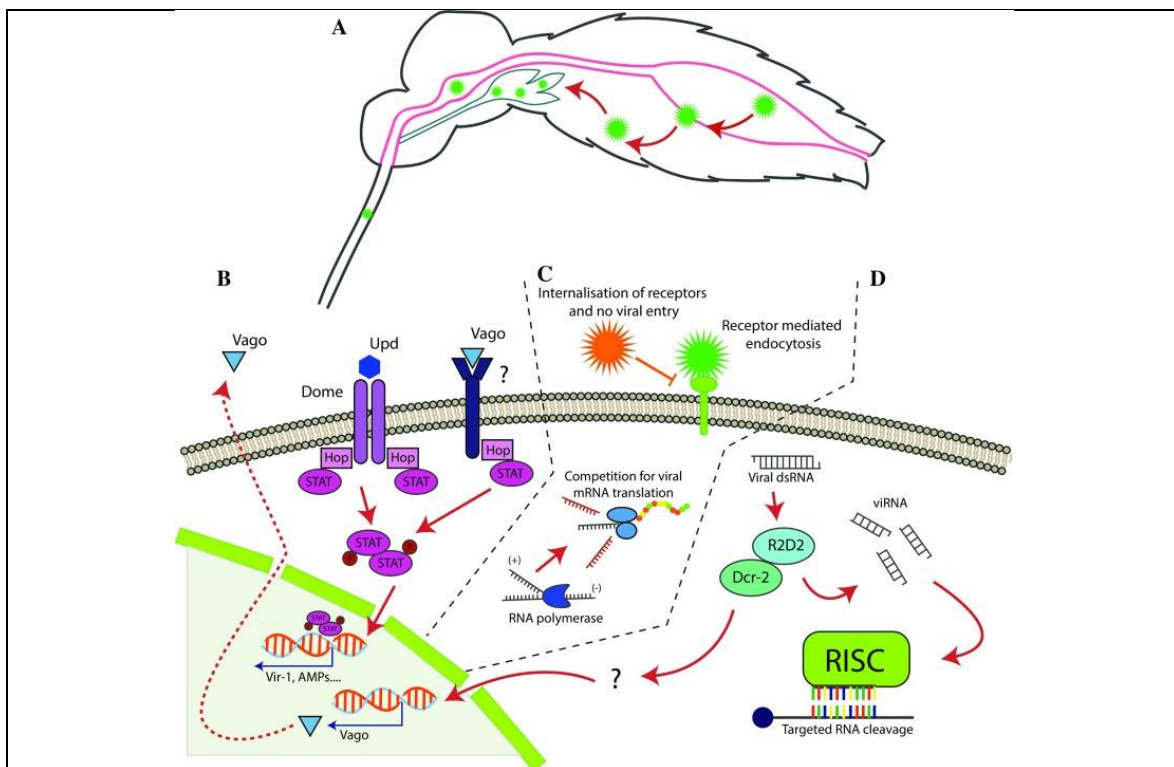


Fig. 9. Descripción de algunos mecanismos antivirales en los mosquitos. A) ciclo replicativo, B) vía Jak-Stat, C) mecanismos de competencia o modificación de recursos que reducen la unión al receptor D) RNAi. Imagen tomada y modificada de Ohlund, 2019.

Los RNAi producidos por el virus son importante para el bloqueo de la respuesta inmune del mosquito, estos se producen a partir de secuencias no codificantes en regiones UTR y bloquean proteínas como Dicer y XRN1uties para la degradación de RNAs, recientemente se ha observado que la potreina NS2A actúa también como un RNAi, bloqueando la producción de RNAs de la célula hospedero (*Hussain, 2014*).

-Humano/Primates no humanos

En el humano las células del sistema inmune son las primeras en actuar a través del sistema monocito-macrófago al reconocer al virus por medio de un receptor de reconocimiento de patrones (PRR), induciendo la producción de citocinas y quimiocinas. Dentro de estos PRRs están RIG-1, MDA5, TLR3 y TLR7 que permiten el acoplamiento del virus a estos receptores desencadena la vía de señalización del interferón α/β (IFN) o factor nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) (*Uno; 2018*).

La activación del complemento también es importante, se activa a través de la vía de las lectinas, permitiendo la lisis de células infectadas, sus subproductos como C3 y C5 las cuales tiene un papel quimio-atrayente recluten a células fagocíticas y moléculas de inflamación (*Avirutnan, 2011*).

La regulación por miRNAs es importante para la inhibición de respuesta inmune en hospederos vertebrados, dos miRNAs han sido estudiados en cultivos del DENV en células Vero y Hela, el miR-484 y miR-744, son blanco específico de lo RNAsf producidos en la región 3'UTR, lo cual nos habla de un mecanismo mediado RNA de interferencia (*Castrillón-Betancur, 2017*). Por el contrario, se ha sugerido el uso de miRNAs como el miR-122 para bloquear la replicación de DENV en tejido específico como el hígado y esto abre el camino hacia el desarrollo de terapias a través de la RNAi (*Lee, 2010*).

Otros dos mecanismos importantes son el proceso de autofagia y apoptosis los cuales inducen a la muerte de células infectadas. Los mecanismos de autofagia permiten la eliminación del virus en células monocitos; a nivel de la apoptosis las proteínas NS2b-NS3 son las proteínas que inducen el mecanismo a través de la vía de las caspasas (*Panyasrivanit, 2011; Shafee, 2003*).

Protección mediada por anticuerpos, los pacientes que han sido infectados por dengue inician con la producción de anticuerpos IgM y IgG, siendo esta última la que le confiere protección una mayor protección, estos se dirigen contra la proteína E, especialmente contra el dominio III de unión al receptor, otras proteína que generan anticuerpos es prM, sólo que estos son más débiles. En el caso de dengue estos pueden presentar reacción cruzada contra los otros serotipos, siendo los de un primo infección más débiles en comparación con los de una infección secundaria, también se ha documentado reacción cruzada entre sueros de dengue y zika (*Priyamvada, 2016; Elong, 2018*).

Interacciones proteína-proteína.

Dentro de los estudios de interacción proteínas virales con proteínas del hospedero encontramos, que en el mosquito las proteínas C, NS3, NS5 y prM presentaban interacción

con 102 proteínas de las cuales 93 eran únicas de mosquito y 58 tenían ortólogos humanos, dentro de estas se encontraba la interacción de NS5 con la ubiquitina ligasa E3 del mosquito. En el humano se encontró 46 interacción con las proteínas C, NS3 y NS5, de estas 6 interacciones se conocían previamente, como la de la cápside como la proteína beta hemoglobina y NS3 con NF- κ B (*Mairiang, 2013*) Figura 9.

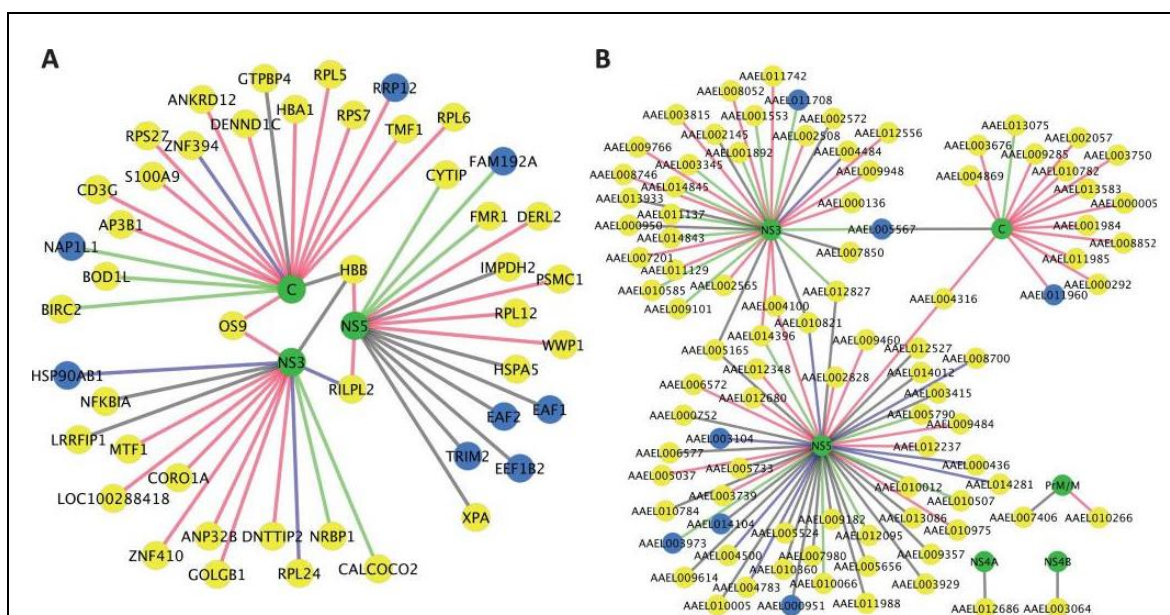


Figura 10. Interacciones proteína-proteína. A) Dengue-Humano, B) Dengue-Mosquito. Imagen tomada y modificada de *Mairiang, 2013*.

En cuanto a zika los estudios de interacción con proteínas humanas han encontrado 157 nodos y 187 interacciones entre las proteínas no estructurales y proteínas del humano, 29 de estas interactuaban con más de una proteína NS, dentro de estas tenemos interacciones entre chaperoninas (involucradas en de la telomerasa de RNA y de cuerpos de Cajal) y NS1 (*Golubeva; 2020*). Otra interacción importante es la de NS4A con ANKLE2 una proteína asociada a microcefalia de tipo autosómica recesiva, esta interacción podría estar asociada con las complicaciones de sistema nervioso asociados a la enfermedad (*Shah; 2018*).

Modificaciones postraduccionales en las proteínas virales

Los mecanismos postraduccionales de la proteínas permiten mejor la eficacia de algunas de sus funciones o disminuirlas. Uno de estos mecanismos es la ubiquitinación, el cual permite añadir moléculas de ubiquitina a una proteína de interés en residuos de lisina, este mecanismo se ha podido observar en la proteína E del zika, el cual permite una mejor unión y entrada a la célula del hospedero, sin embargo, necesita estar interactuando con otra proteína K63 para

poder presentar esta modificación, mejora la interacción con el receptor Tim-1 esto se ha podido apreciar en cultivos de células humanas (*Giraldo; 2020*). En dengue se ha visto que es el receptor TIM-1 el que debe ubiquitinizarse en dos residuos para permitir la endocitosis (*Dejemac; 2018*).

La sumoilación es el agregación de grupos SUMO (pequeñas ubiquitininas- relacionadas a modificación), se ha podido observar esta modificación en la proteína NS5, permitiendo una mayor estabilidad, además este mecanismo se asocia mucho a proteínas de localización nuclear y se ha visto que la señal de localización nuclear de NS5 también tiene sitios de sumoilación, aunque todavía falta dilucidar la función, otros estudios han visto el papel de esta modificación en NS5 y funciones asociadas a la estimulación de genes de interferón y respuestas al ciclo celular que permiten la persistencia a la infección en el ZIKV (*Su, 2016; Conde, 2020*).

La glicosilación es el proceso de adición de glicanos a una proteína, la proteína E de los *flavivirus* presenta un sitio conservado en la posición asparagina 153 y en dengue se presenta otro sitio exclusivo en asparagina 67, al realizar mutaciones en estos sitios se ha podido observar una disminución en la infectividad en las células sobre todo en células de humano en comparación con mosquito (*Mondotte; 2007*).

La metilación es la adición de grupos metilos (-CH₃) en nucleótidos de citosina, en los *flavivirus* importante tener metilado la región N-7 que permite mejorar la traducción y 2'-O que permite evadir algunos mecanismos de la respuesta inmune, ya que los que carecen de ella son reconocidos y degradados fácilmente por mecanismos del sistema inmune (*Dong, 2014*).

Enfermedades.

Ambos virus se caracterizan por la presencia de cuadros febriles con sintomatología inespecífica como cefalea, astenia, adinamia, mialgias, artralgias, náuseas, vómito, eritema, rash, etc (*Rigau-Pérez, 1998*).

Dengue.

Uno de cada cuatro personas infectadas con dengue presentará síntomas de leves a graves, esto dependerá de factores como el serotipo del virus y la inmunidad del hospedero (*Severine; 2020*). La historia natural de la enfermedad se caracteriza por tres fases: la fase febril, fase crítica y fase de recuperación (*Bandyopadhyay, 2006*).

Fase febril: caracterizada por fiebre alta y de inicio súbito, se presenta de 2 a 7 días y puede estar acompañada de rubor facial, eritema, astenia, mialgias, artralgias, cefalea y dolor retro-ocular, en ocasiones pueden presentar otros síntomas similares al de un resfriado o enfermedad gastrointestinal, con el paso de los días puede presentarse petequias, equimosis y hepatomegalia; la biometría hemática puede presentar leucopenia (*Simmons; 2012*).

Fase crítica: puede iniciar desde los primeros 3 días a 7, con un descenso de la temperatura y un aumento la permeabilidad capilar, incrementando la concentración del hematocrito y pueden presentarse las manifestaciones hemorrágicas: epistaxis, gingivorragia, metrorragia o hipermetrorragia, en esta fase inicia la disminución del recuento plaquetario y el aumento de la permeabilidad puede llevar a la pérdida de volumen plasmático con acumulación en cavidades (derrame pleural y ascitis) y a presentar signos de alarma (*Srikiatkhachorn; 2007*).

En esta fase puede presentarse cambios de presión, deterioro del estado de alerta sobre todo en niños, taquipnea, taquicardia y hasta descompensación hemodinámico llevando a un estado de choque.

Fase de recuperación: se caracteriza por una reabsorción del líquido extravasado, durante las 48 a 72 horas posterior. Con una recuperación favorable por parte del paciente a nivel hemodinámico; dentro de las alteraciones en piel durante esta etapa pueden presentar una erupción tardía acompañada de prurito (*Jessie, 2004*).

Las infecciones por dengue pueden presentarse con diferentes grados de gravedad y según la OMS se clasifican en tres tipos: dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, tabla 2 (*OPS/OMS, 2016*).

Dengue sin signos de alarma - DSSA	Dengue con signos de alarma - DCSA	Dengue grave - DG
Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones: 1. Náuseas / vómitos 2. Exantema 3. Cefalea / dolor retroorbitario 4. Mialgia / artralgia 5. Petequias o prueba del torniquete (+) 6. Leucopenia También puede considerarse caso todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente.	Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos: 1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen 2. Vómitos persistentes 3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico) 4. Sangrado de mucosas 5. Letargo / irritabilidad 6. Hipotensión postural (lipotimia) 7. Hepatomegalia >2 cm 8. Aumento progresivo del hematocrito	Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones: 1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar >2 segundos, presión de pulso ≤20 mmHg: hipotensión en fase tardía. 2. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia voluminosa, sangrado del sistema nervioso central (SNC)) 3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT ≥1000 UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos

Tabla 2. Clasificación modificada de la gravedad del dengue OPS/OMS.

Zika

La enfermedad por zika tiene un inicio súbito, caracterizado por la presencia de un exantema maculopapular el cual tiene un inicio cefalocaudal, acompañado de fiebre de baja intensidad, prurito, hiperemia conjuntival y adenopatías. Como en otras enfermedades febriles puede presentarse poliartralgias con edema periarticular, bilateral y simétrico, las articulaciones más afectadas son rodillas y tobillos, además de síntomas inespecíficos, como cefalea, mialgias, náuseas, diarrea y vómito (*OPS/OMS, 2016*).

Las manifestaciones de la enfermedad en el sistema nervioso central pueden aparecer en la fase aguda de la infección o posterior a ella. Entre éstas el síndrome de Guillain-Barré es la más frecuente, aunque también pueden presentarse encefalomiелitis aguda diseminada, mielopatía inflamatoria, encefalitis, meningoencefalitis, cerebelitis y alteraciones de los pares craneales (*Mecharles, 2016*).

Síndrome de Guillain-Barré asociado a ZIKV

Este síndrome se caracteriza por una parálisis muscular ascendente, progresiva, simétrica y aguda, acompañada de ausencia de reflejos, al estar asociada a la presencia del virus se pudo observar que tiene una forma de neuropatía aguda axonal motora, con un riesgo de 0.24% por cada 1000 infecciones. A nivel clínico se considera una parálisis flácida aguda, que puede afectar las cuatro extremidades, con inicio en las extremidades inferiores y dificultad para la deambulación, posteriormente se va extendiendo a brazos; puede acompañarse de parestesias, hipoestesias, disestesias, alteraciones de la sensibilidad, dolor de tipo neuropático, afección a pares craneales, compromiso bulbar, de músculos respiratorios y disautonomías (*Cao-lormeau, 2016; Carteaux, 2016*).

Síndrome congénito asociado a la infección por ZIKV.

Este síndrome se caracteriza por la presencia de microcefalia, desproporción craneofacial, cuero cabelludo redundante con rugosidad, hipertonía, irritabilidad, crisis epiléptica, pie equino varo o artrogriposis. Además, se ha corroborado la presencia de distintas alteraciones en sistema nervioso central, de las cuales destacan: calcificaciones cerebrales de predominio cortical y subcortical, alteraciones en los ventrículos, anomalías de fosa posterior y lisencefalia. Asimismo se han documentado alteraciones visuales y auditivas como hipoacusia central, atrofia coriorretiniana, alteraciones pigmentarias de retina y hipoplasia de nervio óptico (*Kleber, 2016; Meaney-Delman, 2016*).

Además, se ha registrado una elevación en el número de abortos espontáneos y muertes fetales en presencia de la infección por ZIKV (*Sarno, 2016*).



Figura. 11. Síndrome congénito asociado a la infección por ZIKV. Imagen tomada y modificada de la CDC.gov.

Antecedentes particulares.

La diversidad genética está definida como las variaciones heredables que existen entre individuos de una población dentro de la misma especie (*Piñero, 2008*). La diversidad genética es moldeada por distintos mecanismos de evolución: la selección natural (cambio en la frecuencia de variantes de acuerdo con su adecuación) o la deriva génica (el cambio de frecuencia de variantes por procesos aleatorios) (*Forrester, 2014*). Al igual que otros virus de RNA, ZIKV y DENV forman poblaciones heterogéneas dentro del hospedero infectado, esto se debe a la alta tasa de mutación de dichos virus, el corto tiempo de generación y el gran tamaño de la población viral. La alta tasa de error en la replicación del virus origina variantes de un solo nucleótido (SNV) en las secuencias virales, dando lugar a un aumento en la diversidad genómica intra-hospedero. La diversidad genómica de las poblaciones virales permite la acción de los mecanismos de selección (*Collins, 2019; Forrester, 2014; McCrone, 2018*). Estas poblaciones virales heterogéneas tienen mayor capacidad de adaptación, una mayor adecuación, lo que les permite soportar eventos de cuello de botellas y responder a las presiones de selección positiva y negativa que les permiten transmitirse a un nuevo hospedero (*Sim, 2015*), Figura 10.

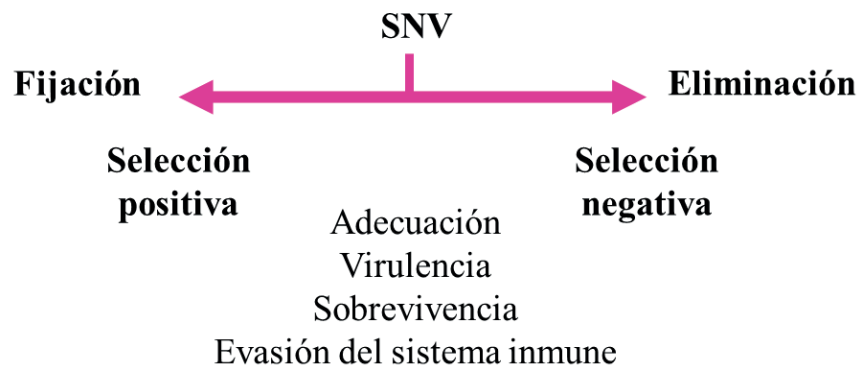


Fig. 12. Mecanismos involucrados en la selección natural.

a) Tasa de mutación

RNA polimerasa y la replicación.

La proteína NS5 es multifuncional y conservada evolutivamente en los *flavivirus*, tiene una característica importante que difiere en ambos virus a nivel de su estructura, en DENV se presenta más compacta y en ZIKV es abierta y alargada, ambas sintetizan RNA de cadena negativa y positiva, poseen una baja fidelidad, que impulsa una variación genética, como resultado se genera una población de genomas virales estrechamente relacionados pero genéticamente distintos, los cuales pueden contribuir en la adecuación y funciones de los virus (*Sahili, 2019; Sim, 2015*).

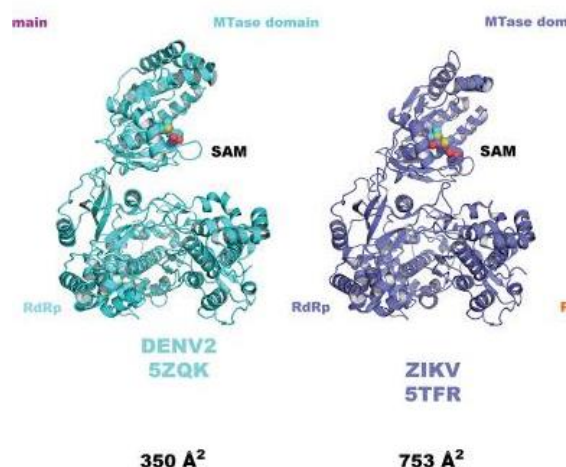


Fig. 13 Estructura cristalográfica de NS5 de DENV2 y ZIKV. Imagen tomada y modificada de Sahili, 2019.

La replicación de los virus de RNA se caracteriza por la alta frecuencia de mutaciones (Forrester; 2018). La tasa de mutación en los arbovirus es de 10^{-4} errores por sitio lo que corresponde a un error por cada genoma de 10 kb (Coffey; 2011). Logan y cols. estimaron que la tasa de mutación para ZIKV varía de 12 a 25 mutaciones/año en un genoma de 10,272 bases (Logan; 2016). Para DENV1 la tasa de mutación del gen E se ha estimado en 1.33×10^{-3} subs/sitio/año (Hupurachchi; 2016). Las tasas de sustituciones cambian en algunos linajes, en DENV-1 es de 4.55×10^{-4} subs/sitio/año y en DENV3 es de 9.01×10^{-4} subs/sitio/año (Twidd, 2003).

Una de las causas de esta mayor frecuencia de mutaciones se debe a la baja fidelidad que posee a RNA polimerasa dependiente de RNA, en consecuencia, se presentan distintos SNVs en las poblaciones virales, dando como resultado genomas virales muy relacionados, pero genéticamente diversos, constituidos en torno a una secuencia consenso, dentro de su hospedero (Sim, 2015; Lequime, 2016).

Los mecanismos por los cuales se mantiene la diversidad genética de las poblaciones virales en mosquitos aún son desconocidos (Sim; 2015). Por esta razón, el estudio de la distribución de SNVs permitiría identificar variantes que puedan potencialmente ser favorecidas por la selección e incluso llegar a afectar su adecuación (Rodríguez-Roch, 2016).

Existen diversos estudios sobre la diversidad genética en los arbovirus que indican que la replicación alternada en insectos y vertebrados restringe la evolución de estas poblaciones virales al imponer presiones selectivas (Filomatori, 2017). En algunos arbovirus se ha observado que la fijación de unas pocas mutaciones puede aumentar significativamente la adecuación del virus. Por ejemplo, en estudios *in vitro* mostraron que al pasar alternativamente virus de estomatitis vesicular (VSV) entre células de mamífero y células de insecto se incrementaba la adecuación en células de insecto, pero no se observaba un aumento en células de mamífero, indicando la existencia de un *trade-off* asimétrico de las mutaciones acumuladas siendo la fase de replicación en células de insecto la que domina el proceso evolutivo (Zárate, 2004).

En el caso de DENV se ha argumentado que algunas mutaciones pueden ser perjudiciales para las poblaciones virales; (Lui, 2018). En este sentido, se ha reportado la presencia de un codón de paro prematuro en la posición 248 (nucleótido 742) de la proteína E de DENV-1 en secuencias obtenidas de humanos y mosquitos en Myanmar. Esta mutación generó una isoforma de 27 kDa no funcional, este locus un representa un *hot spot* para mutación y se asocia a la mutación escalonada de siete mutaciones (T242S, E269G, Q316R, D363G, S373F, D417G y G458E) que repercuten muy probablemente en la adecuación del virus (Aaskov, 2006). La aparición de partículas defectuosas interferentes (DI), es otro ejemplo de diversidad genética, las partículas DI se caracterizan por la pérdida de grandes segmentos del genoma del virus parental y los fragmentos residuales del sub-genoma se replican con ayuda de virus completos coexistentes; estudios in vivo han podido determinar la presencia de estas partículas DI en poblaciones DENV obtenidas de humanos hospitalizados con sintomatología atenuada de la enfermedad (Li, 2018).

Parameswara y cols. estudiaron la diversidad intra-hospedero de DENV-3 a partir de muestras de células mononucleares de sangre periférica de humanos con primera infección o segunda infección. Los autores observaron que, durante procesos de infecciones agudas en humanos, se presentaba una rápida evolución intra-hospedero en las poblaciones de DENV-3, probablemente llevadas a fijación por presiones selectivas del sistema inmunológico (Parameswaran, 2017). En poblaciones de DENV obtenidas de pacientes, se han observado mayores niveles de diversidad genética intra-hospedero en los dominios de la proteína E. Otro mecanismo que favorece la diversidad genética es el RNA de interferencia (iRNA) de los mosquitos, este desempeña un papel clave en las defensas contra el patógeno, impulsando la variación de mutaciones que le permitan al virus escapar de este sistema de control (Sim, 2015).

Uno de los desafíos a los que está sujeta la diversidad genética en los procesos de infección en el hospedero son las reducciones en los tamaños de las poblaciones virales debido a cambios demográficos intra-hospederos. La diversidad genética suele reducirse durante el paso de un hospedero a otro debido a la disminución del tamaño de su población. En los arbovirus los niveles altos de variación genética intra-hospedero podrían favorecer la adecuación; Jerzak y cols. estudiaron los niveles de variación intra-hospedero *in-vitro*, evaluaron si la infección transmitido por mosquitos presentaba una mayor variabilidad que la transmitida por las aves, esto al usar el WNV derivado de un clon de DNAC infeccioso transmitido veinte veces y determinar los tamaños y la variabilidad de las especies mutantes. Los autores observaron que en los mosquitos se presentan un mayor número de variantes genéticas y eran menos patogénicas al infectar ratones, lo que favorece la supervivencia de estos; Por lo anterior, se propuso que los mosquitos son fuentes de variación y las aves lugares donde se lleva a cabo una mayor selección negativa de las variaciones (Jerzak, 2007; Lequime, 2016).

Un estudio de cepas virales de 4 países de África Occidental en el periodo de 1947 a 2007, identificó sitios en el genoma del ZIKV sujetos a presión selección negativa (Faye, 2014).

Durante la transmisión horizontal se pueden perder SNVs adquiridas en el hospedero o vector previo, sin embargo, algunos estudios sugieren que existe un equilibrio entre los niveles de diversidad genética. Sim y cols. determinaron que los niveles de diversidad genética intra-

hospedero en muestras de pacientes con dengue y mosquitos, los cuales se alimentaron de las muestras de pacientes infectados, se mantuvieron similares durante la replicación en hospederos humanos y mosquitos. Aunque más del 90% de SNV se perdían en el proceso de transmisión de un hospedero al otro, la diversidad se mantuvo mediante la regeneración de nuevos SNV en cada etapa (*Sim, 2015*).

Zárate y cols. al analizar secuencias de DENV originarias de mosquitos y humanos encontraron 15 sustituciones no sinónimas y 88 sustituciones sinónimas que aparecían con una frecuencia mayor en virus obtenidos de mosquitos. Además, algunos de estos sitios se mantenían como polimórficos en al menos una de las muestras analizadas lo que sugiere podrían contribuir al mantenimiento de la adecuación de las poblaciones virales en los eventos de transmisión (*Zárate, 2019*).

En el caso del ZIKV se han realizado menos estudios sobre la diversidad intra-hospedero, sin embargo, algunos cambios en el efectos citopáticos se han asociado con la sustitución A1263V en el ZIKV reportada por Alpuche-Lazcano y cols. (*Alpuche-Lazcano, 2018*). También se ha reportado que mutaciones en los residuos conservados F56K y F84K interrumpen el plegamiento de la proteína C (cápside), dando como consecuencia un agregado soluble (*Li, 2018; Shrivastava, 2018*).

En el DENV1 se ha observado que las mutaciones en el gen E en las posiciones D54N, T226A, I347M, I347V, A463V aumentan su neutro-virulencia durante el desarrollo de la infección (*Dang, 2020*).

b) Cuellos de botella.

Los arbovirus cruzan diversas barreras anatómicas para el establecimiento y mantenimiento de la infección en sus vectores artrópodos las cuales representan cuellos de botella para la población viral, estas barreras contribuyen a la disminución de variabilidad genética, Los cuellos de botella pueden disminuir la adecuación favoreciendo la acumulación de variante deletéreas que no podrán ser eliminadas por la selección negativa, de acuerdo con el trinquete de Muller (*Forrester, 2014*). Los cuellos de botella son un ejemplo claro de deriva génica, estas reducciones se pueden presentar en el establecimiento de la infección, diseminación y transmisión, teniendo consecuencias profundas para la evolución de los arbovirus y siendo un desafío para el mantenimiento de la diversidad en las poblaciones (*Forrester, 2014; Lequime, 2016*).

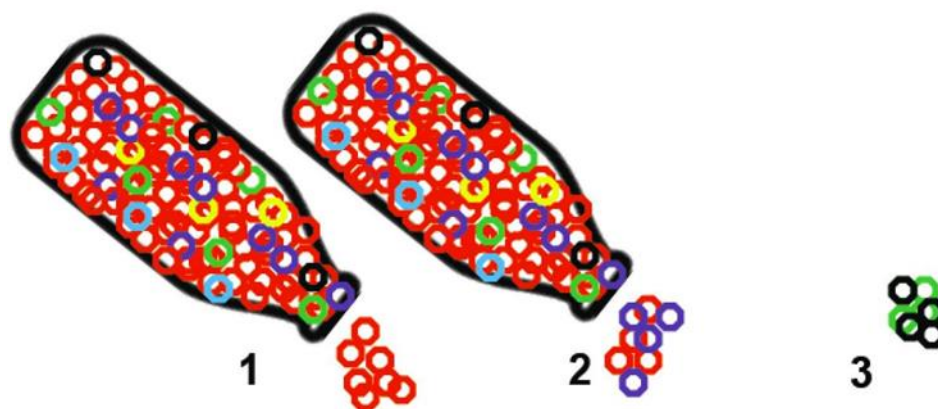


Figura. 14. Mecanismos de cuello de botella. 1) la subpoblación más grande se mantiene después del cuello de botella, 2) Aunque la variabilidad del virus disminuye, se retiene una pequeña cantidad de diversidad viral. 3) la diversidad de la población de virus cambia significativamente debido a la supervivencia aleatoria. Imagen tomada y modificada de *McCrone y cols. 2018*.

Tipos de selección.

Los tipos de selección en los genomas y secuencias se pueden estimar utilizando los valores de dN/dS (número de sustituciones no sinónimas/número de sustituciones sinónimas), cuando el valor de este es igual a 1, tenemos la presencia de selección neutral, si es menor <1 tendremos selección negativa en la mayoría de las mutaciones no sinónimas y si es >1 con presencia de selección positiva en las mutaciones no sinónimas. La presencia de mutaciones sinónimas se presenta en la selección neutral dado al no presentarse cambios en los aminoácidos (*Costa, 2012*).

c) Procesos de selección positiva.

Un ejemplo de sitio sujeto a selección positiva en DENV se encuentran en la proteínas no estructural NS1, estos sitios pueden estar involucrados en mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero o en sitios de interacción proteína-proteína.

NS1 es importante para la replicación viral, y presenta múltiples funciones intra y extracelulares. Por ejemplo, al secretarse en su forma homodimérica se asocia a la membrana celular y es muy inmunogénica y contribuyen a la patogenicidad. En ZIKV esta proteína favorece la evasión de la respuesta a interferón por parte del hospedero (*Grubor-Bauk, 2019*).

Seroni y cols. encontraron que la proteína NS1 se encuentra bajo selección positiva durante el proceso de especiación de los *Flavivirus*, esto se observó en la reconstrucción de árboles filogenéticos de *Flavivirus* se detectaron un total de 16 sitios de selección episódica, y 7 de estos se encontraron en la proteína NS1, distribuidos a lo largo de toda la proteína en epítomos inmunes de células T (por ejemplo los sitios P112 y G114 validados en DENV) o regiones proteicas que participan en interacciones proteína-proteína (Y22 juega un papel en las interacciones homodiméricas de NS1, A77 presenta un papel en la estabilización de interacciones de la proteína, H164 esencial para la replicación viral, G185 localizados en

sitios de interacción dimérica). La presencia de selección positiva en los sitios de epítomos sugiere una presión del sistema inmune adaptativo del hospedero; otras proteínas NS donde se encontraron sitios de selección positiva relacionados con epítomos fueron en NS4B y NS5 (Sironi) Figura 15.

En el virus del Nilo occidental la mutación 2K-V9M de la proteína NS4A se encuentra bajo selección positiva y presenta una mayor adecuación en los mosquitos con mayores tasas de diseminación entre este hospedero en comparación con el genotipo silvestre. Esta mutación altera las interacciones de la proteína, favoreciendo la estabilidad de complejos de replicación al modificar la función de la proteína 2K-NS4B necesaria para la formación de estos complejos replicativos (Campbell, 2014). Hay que tener en cuenta que una de las limitaciones de la selección positiva en los virus RNA es la alternancia entre hospederos que interrumpe el proceso de selección (Shrivastava, 2018).

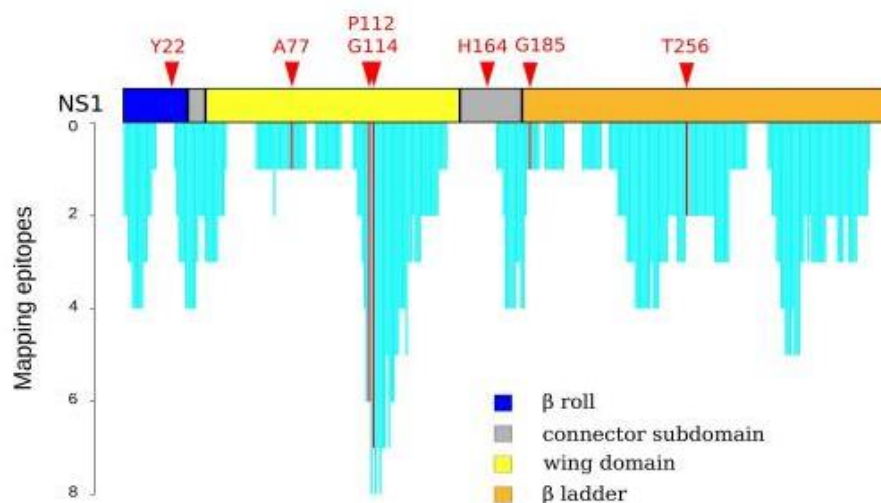


Fig. 15. Sitios de epítomos sujetos a presiones de selección positiva en NS1. Imagen tomada y modificada de Sironi, 2017.

d) Procesos de selección negativa

Las UTRs han permitido estudiar los procesos de selección negativa que se presentan en los distintos hospederos, en el caso de la UTR 3' se caracterizada por poseer regiones talla-burbuja que permite la formación de RNA subgenómico de *flavivirus* (RNAsf), la variación genética in vitro en esta región en células de mosquito infectadas con dengue permite que se generen al menos dos RNAsf (RNAsf3 y RNAsf4), sin embargo, al pasar a células humanas en cultivo se vio una disminución de estas variaciones y la formación de un solo RNAsf (RNAsf1), esto nos habla de mecanismos de selección negativa que eliminan la variación adquirida en el hospedero previo, algo a destacar es que esta eliminación de la variación permite una supervivencia del virus en el nuevo hospedero, ya que la permanencia

de las variantes de mosquito en células humanas producían una respuesta inmune mayor contra el virus (*Filomatori, 2017*).

Evolución de arbovirus

Existen más de cinco mil arbovirus, los cuales se encuentran distribuidos en cinco familias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Togaviridae*. Las características más destacadas de estos virus son:

- El proceso de transmisión se lleva a cabo por un artrópodo (dípteros y ácaros en mayoría).
- Al ser virus de RNA presentan tasas de mutación muy altas.

Con respecto a las altas tasas de mutación y su gran tamaño de población en el hospedero permite la presencia de una alta variación genética. Sin embargo, que sus genomas sean pequeños permite que no acumule un gran número de mutaciones deletéreas. Se ha postulado que estas características han ayudado a virus como DENV y virus de fiebre amarilla (YFV) a la capacidad de infectar hospederos muy diversos (*Tabachnick, 2016*).

Presiones evolutivas en los arbovirus

Los invertebrados y vertebrados presentan una diferencia de más de 570 millones de años en su evolución, lo que los hace organismos muy diversos con sistemas inmunes diferentes. La alternancia de los arbovirus en estos hospederos impone presiones de evolución, haciendo que haya diferentes regiones de acumulación de mutaciones, uso de nucleótidos y codones diferentes (*Sexton, 2019*).

En los vertebrados la selección negativa promueve la evolución en los virus con genomas más adecuados para evitar la estimulación por el sistema inmune, sobre todo a nivel de PRRs (receptores que reconocen patrones), además de una selección positiva ocasional que le ayude a evadir la respuesta inmune adaptativa. En los artrópodos es importante la selección negativa, sin embargo, las secuencias también deben presentar variación, para lograr evadir la respuesta de RNAi que van dirigidas hacia las secuencias más comunes. Este se puede apreciar en el WNV ya que su paso por el artrópodo favorece la diversidad de los genomas y en las aves se presenta una selección negativa (*Grubaugh, 2016*).

Estudios comparativos sobre la replicación en uno y en múltiples hospedero, han permitido observar, que no hay disminución en la adaptación del virus y la secuencia consenso sigue siendo muy similar con el paso de las rondas de replicación (*Ciota, 2010*).

Las estructuras secundarias del RNA viral, son importantes en distintos procesos biológicos permitiendo la evadir la respuesta inmune y para el proceso de replicación. Las modificaciones que sufren estas estructuras con el paso de un hospedero a otro son poco

conocidas y podrían ayudar a la explicación del mecanismo de infección en distintos hospederos (Sexton, 2019).

El uso de codones en distintos hospederos puede variar, este se asocia al contenido de citosina y guanina, la presencia de dinucleótidos, la expresión de RNAt en el hospedero, las proteínas presentes y los mecanismos del sistema inmunitario. En el genoma de los mosquitos se observa un bajo uso del codón AGG el cual se puede deber a que no codifica el aminoácido en los distintos hospederos codificando una lisina en lugar de arginina (*Abascal, 2006*). Factores más importantes se encuentran el RNAt el cual puede sufrir modificaciones que comprometan su fidelidad en la traducción.

La preferencia por el uso de ciertos dinucleótidos es importante, los virus de RNA prefieren evitar el uso de ciertos dinucleótidos como CpG y UpA, ya que existen diversos mecanismos del huésped dirigidos contra estos, como el uso de proteínas dedos de zinc que agotan los RNA viral ricos en CpG y la degradación de RNA rico en secuencias AU (*Takata, 2017*). Estudios en células de vertebrados con DENV y ZIKV han podido determinar que la presencia de mutaciones en codones preferenciales de mosquito reduce los títulos virales en los cultivos, este efecto fue más marcado en ZIKV (*Li, 2018*).

La evolución de los arbovirus ha podido ser estudiada en diversas condiciones; los estudios in vitro sobre la adaptación del virus en diversos hospederos han descrito que DENV cultivados en líneas celulares de mosquito C6/36 presentan una menor acumulación de mutaciones, frenando la evolución viral de las poblaciones virales (*Vasilakis, 2009*); sin embargo, los estudios de poblaciones silvestres de mosquito han encontrado un mayor número de SNV en los genomas derivados de mosquito (*Zárate, 2019*), al igual que con el ZIKV (*Izquierdo- Suzán, 2019*).

Competencias vectorial

La competencia vectorial está determinada por factores genéticos y ambientales las siendo las interacciones entre estos las que determinan la presencia de variación (*Tabachnick, 2013*). La competencia vectorial se define como el conjunto de factores que permite al artrópodo infectarse de un patógeno en particular y posteriormente transmitirlo a un hospedero susceptible (*Hardy, 1988*).

Los factores ambientales incluyen, tenemos los cambios en el hábitat del vector inicialmente los vectores eran endémicos y estaban restringidos a regiones particulares, sin embargo, en las últimas décadas se han extendido a nuevas regiones tropicales, subtropicales y templadas, estando limitado a zonas del continente africano y sudeste asiático, actualmente se presenta en todos los continentes (*Lwande, 2015*) Figura 16. Los factores que le han permitido al vector una mayor distribución son los geográficos como la globalización y cambio climáticos, esto ha permitido un aumento significativo en los casos reportados de dengue y zika (*Tabachnick, 2016*). La temperatura es un factor importante, ya que la a

temperaturas más elevadas existe una mayor susceptibilidad de los mosquitos a la infección por arbovirus favoreciendo la replicación del virus (*Reisen, 1993*) otros factores que influyen en la competencia son la exposición a insecticida, el pH y la humedad (*Hardy, 1983*).

Los factores genéticos para la competencia del vector incluyen la expresión de proteínas y RNAs en respuesta a la infección y carga viral (*Tabachnick, 2013*).

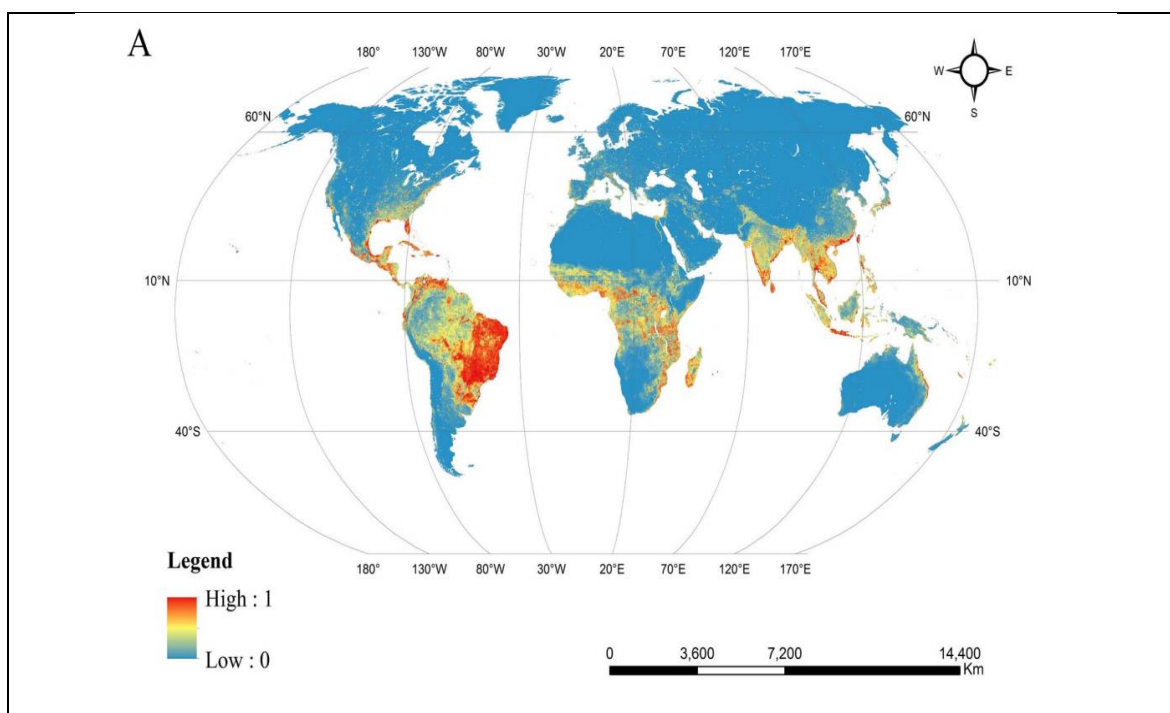


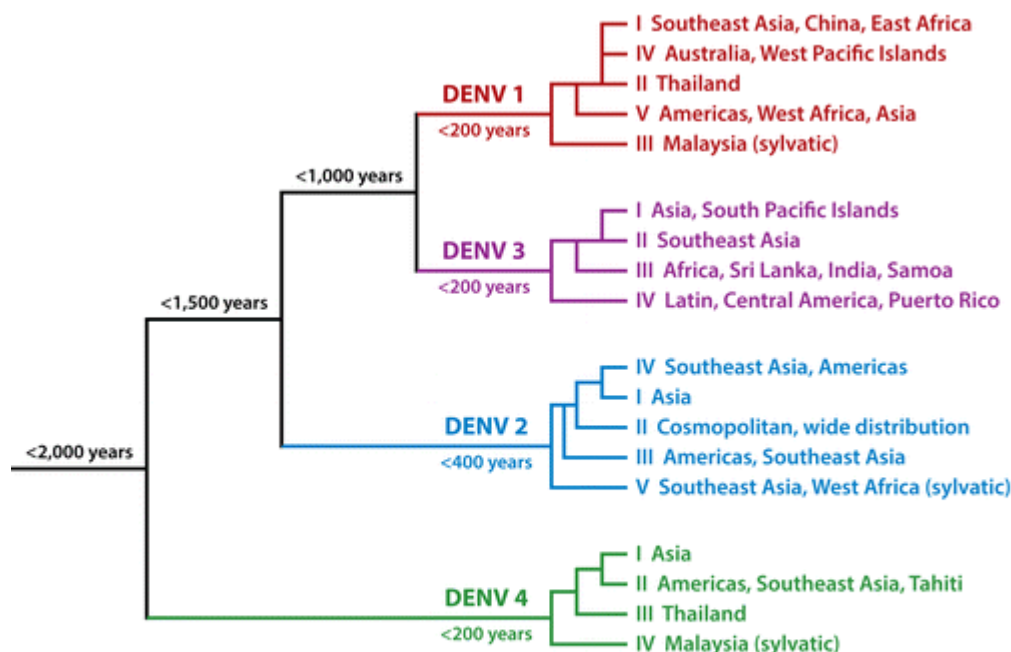
Fig. 16 Distribución global de *Ae. Aegypti*. Las zonas en rojo presentan una alta distribución del mosquito y las zonas en azul una baja. Imagen tomada y modificada de Li 2018

Evolución del virus del dengue.

Los estudios filogenéticos del dengue han permitido realizar árboles dentro de la clasificación de serotipos y genotipos (Figura 17), siendo estos últimos secuencias de nucleótidos con menos del 6% de diversidad en la secuencia de nucleótidos. La tasa de mutación en DENV es menor en comparación con los virus de RNA no transmitidos por vector, esto por presencia de dos ciclos de replicación en hospederos diferentes y siendo el mosquito el hospedero con mayor limitación para la evolución viral (*Lin, 2004*).

El origen del DENV se propone fue en Asia, originado por ciclos de replicación selváticos, se han documentado aislamiento de los distintos serotipos en las regiones silvestres del país y se encuentra presente uno de los vectores con mayor competencia *A. albopictus*. Los estudios filogenéticos ha estimado que su aparición fue hace unos dos mil años. Se ha postulado que el salto a los humanos fue hace unos mil años para DENV2, 600 años para DENV4 y 200 años para DENV1 y DENV3 (*Twiddy, 2003*).

La proteína E es una de las principales proteínas involucrada en la diversidad de los serotipos, es la que más secuencias tiene disponible en las bases de datos y esto a ha facilitado el estudio de la evolución del virus, posee un tasa de mutación 7.6×10^{-4} sustituciones por sitio/año.



Tabachnick WJ. 2016.
Annu. Rev. Virol. 3:125–45

Fig. 17. Serotipos y genotipos del virus del dengue. Filogenia temporal desde el ancestro más común. Imagen tomada y modificada de Tabachnick, 2016.

Evolución del virus del zika.

El análisis filogenético permitió demostrar la divergencia del virus en dos linajes, el africano que apareció por primera vez en 1947 y el asiático identificado e 1966, posteriormente el asiático se subclasificó en dos clados el asiático y el asiático-americano, estos últimos se han estado propagando cada uno en Asia y América. Además, durante la expansión global se pudieron identificar sustituciones de aminoácidos como el de serina por asparagina en la posición 139 (S139N) en la proteína prM surgiendo en la Polinesia Francesa y el cambio de metionina y treonina por valina en 2634 (M/2634V; T/2634V) en NS5. Otras variantes en las posiciones 139, 982 y 2634 están asociadas con una mayor patogénesis y transmisión (Liu, 2019; Yuan, 2017).

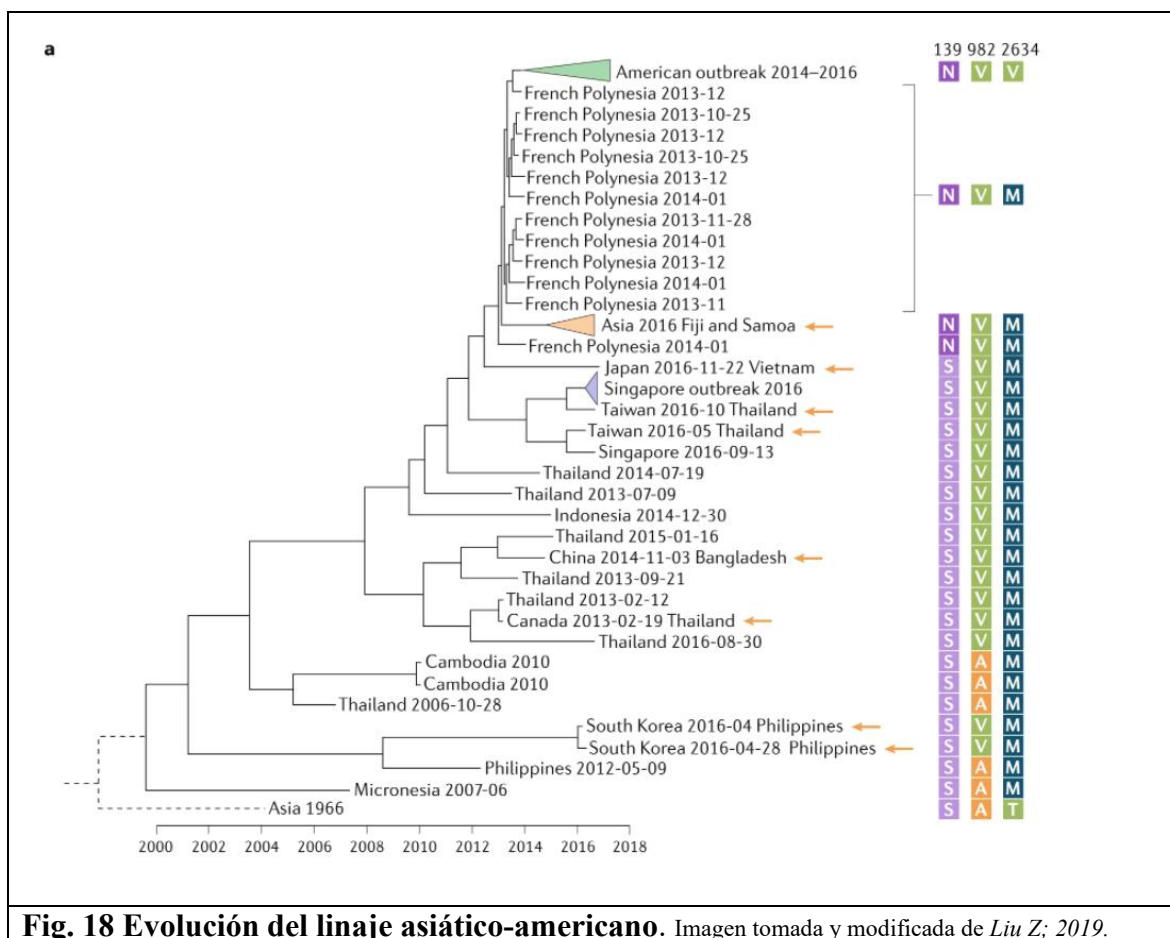


Fig. 18 Evolución del linaje asiático-americano. Imagen tomada y modificada de *Liu Z; 2019*.

Hipótesis.

Los genomas de ZIKV y DENV obtenidos a partir de mosquitos presentan diversidad genética inter-hospedero, que es distinta de la observada en virus obtenidos a partir de pacientes.

Justificación.

Los *Flavivirus* contribuyen a la mortalidad y discapacidad de un gran número de personas a nivel mundial, y son considerados patógenos emergentes y re-emergentes. Recientemente el ZIKV ha sido asociado con una sintomatología diversa que va desde individuos asintomáticos hasta la embriopatía fetal por Zika caracterizada por microcefalia, actualmente no existe una vacuna o tratamiento específico para esta infección viral. Por otro lado, el DENV es la enfermedad arboviral reemergente más importante en el mundo, además se ha observado recientemente un aumento en el número de casos de dengue grave. La mayoría de las secuencias reportadas para estos virus fueron obtenidas a partir de muestras de pacientes, siendo el conocimiento sobre la diversidad de estos virus en poblaciones naturales de mosquitos limitado. Al transmitirse de un hospedero a otro las poblaciones virales están sujetas a presiones selectivas que favorecen la aparición o eliminación de SNV que pueden tener consecuencias en la adaptación y adecuación del virus, además de modificar la patología de las enfermedades que producen. El análisis y comparación de secuencias entre diferentes hospederos nos permitirá identificar las regiones del genoma que presentan mayor diversidad en cada uno de estos, contribuyendo al entendimiento de la dinámica evolutiva de estos virus. Como una perspectiva del presente estudio, estos resultados podrían ayudar a identificar sitios potenciales para dianas terapéuticas.

Objetivo General.

Caracterización de las secuencias de *Flavivirus* obtenidas de mosquitos y humanos.

- **Objetivos particulares.**

- Determinar la presencia de *Flavivirus* en mosquitos adultos colectados en México y plasma de pacientes con síndrome febril.
- Determinar la secuencia del genoma de ZIKV y/o DENV
- Determinar la relación filogenética de las secuencias obtenidas
- Analizar la variación genética de partir de secuencias de ZIKV y DENV de *Flavivirus* de mosquito y de humanos.

Estrategia experimental.

1. Obtención de genomas completos y genotipificación.

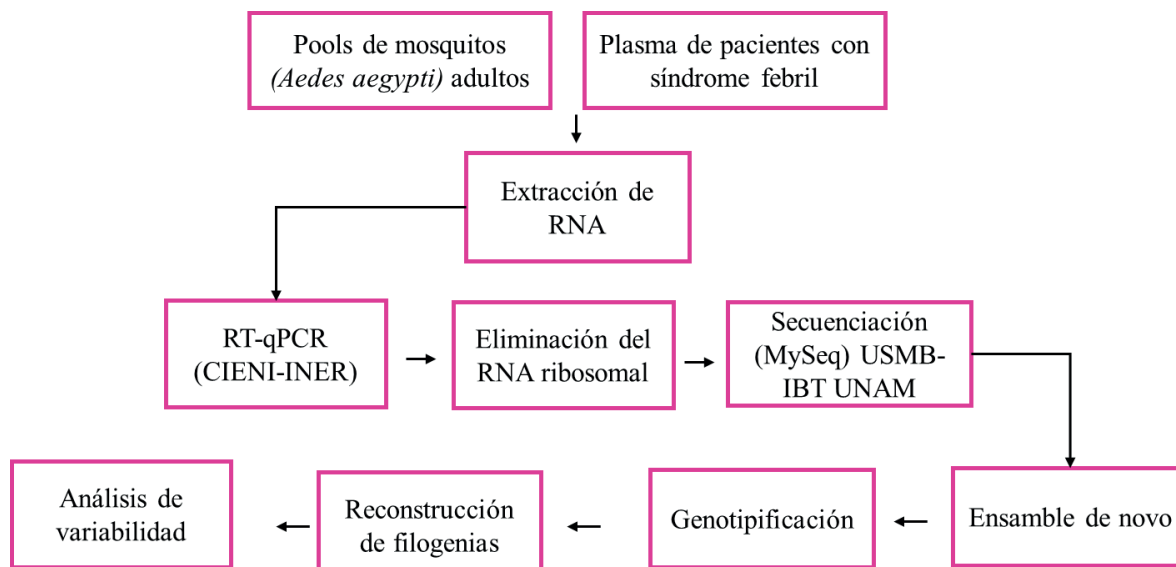


Fig. 19 Estrategia experimental.

Metodología.

- **Muestras.**

Pools mosquitos.

Las muestras de mosquitos adultos fueron colectadas en los municipios de Chilpancingo en el estado de Guerrero y Salina Cruz estado de Oaxaca, durante la última semana de octubre de 2016, la colecta se realizó con apoyo del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) y las M.C. Mónica Izquierdo y Fabiola Hernández.

Se capturaron mosquitos adultos en hogares o alrededores de casos confirmados y/o probables de infección por *Flavivirus*. Los mosquitos fueron clasificados y separados por especie y género y se distribuyeron en *pools* los cuales contienen de 10 a 30 mosquitos y fueron preservados en medio de transporte viral y mantenidos en hielo a 4°C hasta su llegada al laboratorio donde se preservaron a -70° C. Cada pool fue homogenizado en 200 µL de disruptor de tejidos (Qiagen).

Sueros de pacientes.

Las muestras de plasma humanos fueron obtenidas en las localidades de Cuatepec, Tecoaapa y Ayutla de los Libres del estado de Guerrero durante los meses de agosto y septiembre de 2016, donadas por la Dra. Sofia Alcaraz de la División de Medicina Genómica del Centro Nacional “20 de Noviembre del ISSSTE”. Las muestras corresponden a pacientes con diagnóstico de Síndrome Febril. Fueron preservadas en laboratorio a -70°C.

- **Extracción de RNA.**

Pools de mosquitos y suero humano.

La extracción de RNA de los pools de hembras y machos principales de *A. aegypti* de los estados de Oaxaca y Guerrero fueron realizadas por la M.C Monica Izquierdo y la Dra. Martha Yocupicio en el Laboratorio de Virología del Posgrado en Ciencias Genómicas. Las muestras fueron homogeneizadas y se les agregó Trizol en una relación de volumen 3:1, posteriormente se mezclaron vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente. Los clarificados se obtuvieron después de centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min y se recuperó sobrenadante.

Los sobrenadantes se tomaron con el kit QIAamp viral RNA siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 140µL de cada muestra de mosquito o muestra de suero humano y se les agregaron 560µL de buffer AVL con 5.6µL del reactivo acarreador de RNA, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 560µL de etanol y se agitó durante 15s. Posteriormente se transfirió todo el contenido de la muestra a una columna y se centrifugo a 8,000 rpm durante un min, luego se hicieron lavados con 500µL del buffer AW1 y AW2. Por último, se llevó a cabo la elusión del RNA usando 60µL del buffer AVE, se dejó incubar durante 1 min y se centrifugó a 14, 000 rpm durante 2 min. Finalmente se midieron

las concentraciones de RNA y se procedió a guardar las muestras a -70°C. Las muestras se llevaron a una concentración final de 50 ng/μL y un volumen final de 10μL.

- **Detección de arbovirus por RT-qPCR.**

La presencia de los arbovirus (ZIKV, DENV, WNV y CHIKV) en las muestras de RNA obtenidas se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) usando el sistema TaqMan de la plataforma 48.48 Dynamic Array IFCs de Biomark. El kit abarca la detección de 4 serotipos de DENV, los 3 linajes de ZIKV, 3 linajes de CHIKV y 2 linajes de WNV (el protocolo de este método fue establecido por el Doctor Edgar Sevilla Reyes del CIENI en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER).

Después de conocer el número de muestras infectadas con cada uno de los flavivirus mencionados se calculó la tasa mínima de infección (MIR), la cual nos permite estimar la frecuencia de infección en vectores (*Gu, Lampman & Novak, 2004*). Una de las limitantes de esta fórmula es que, se debe obtener una muestra ≥ 1000 especímenes, para tener una mejor estimación.

$$MIR = N^{\circ} \text{ de individuos infectados} / N^{\circ} \text{ de individuos totales.}$$

- **Depleción de RNAr.**

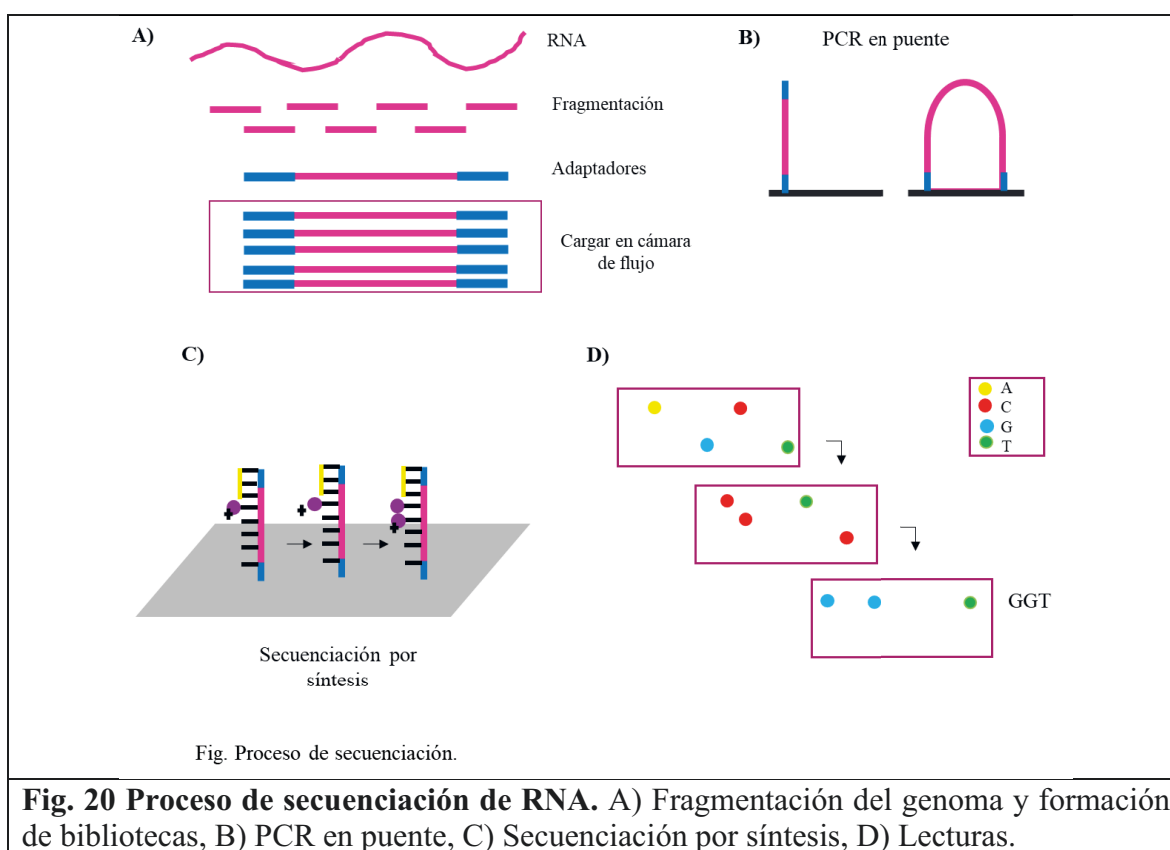
De las muestras que resultaron positivas para arbovirus (pools de mosquito o suero de humano) se eligieron 13 muestras para eliminación de RNAr con el kit NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) con algunas modificaciones a las instrucciones del fabricante. De cada muestra de RNA se tomaron 200 ng de cada muestra y se les agregó agua libre de nucleasas a un volumen de 10μL, para la primera reacción de hidroxilación se agregaron 2 μL de buffer de solución de depleción NEBNext v2 rRNA y 2 μL del buffer de hidroxilación NEBNext a cada muestra para llegar a un volumen de 15 μL por muestra. Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para posteriormente someterlas a los siguientes ciclos de temperatura 20 minutos a 95°C durante 2 min, descendiendo hasta 22 a una velocidad de 0.1°C/segundo.

Posteriormente, se llevó a cabo la digestión por RNase H, para lo cual se agregó a cada muestra 2 μL de buffer RNase H, 2 μL de RNase H termoestable de NEBNext y 1 μL de agua libre de nucleasas. Para tener un volumen final de 20 μL. La mezcla se llevó a un termociclador 30 min a 50°C. Luego se procedió a la digestión enzimática por DNasa I usando 5 μL de la mezcla anterior y 2.5 μL de DNasa I NEBNext y 22.5 μL de agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 50 μL. Se mezcló y se centrifugó, se incubó en el termociclador durante 30 min a 37°C.

Para purificar el RNA tratado se usaron 90 μ L de perlas magnéticas (Nombre del producto de Biolabs), las cuales se mezclaron por pipeteo durante 10 s y se incubaron con las muestras durante 15 min en hielo y posteriormente se separó el sobrenadante usando una gradilla magnética, la pastilla conteniendo las perlas (con el RNA tratado unido) se trató tres veces con 200 μ L de etanol al 80% por 30 s a temperatura ambiente, después se recuperó nuevamente la pastilla la cual se dejó secar al aire durante máximo 5 min. La elusión del RNA tratado se realizó usando 7 μ L de agua libre de nucleasas, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se colocó en la gradilla magnética para obtener 5 μ L de sobrenadante que contiene al RNA tratado, el cual se cuantificó y se guardó a -70°C .

- **Secuenciación.**

Del total de muestras positivas para arbovirus se seleccionaron 13 las cuales se trataron para eliminar el RNAr y se enviaron a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática-Instituto de Biotecnología (USMBIBIT) de la UNAM para la construcción de librerías shotgun RNA Illumina y se secuenciaron usando el sistema de lectura extremos emparejados de Hi Seq (Illumina, <https://www.illumina.com/>).



- **Ensamble de secuencias.**

Antes de realizar el ensamble de las secuencias se evaluó la calidad de las muestras, para lo cual se utilizaron los siguientes pasos: i) evaluación de la calidad de las lecturas mediante FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) ii) limpieza de adaptadores Cutadapt v1.11 (Martin, 2011) y eliminación de las posiciones las posiciones y lecturas de baja calidad (< 20 , corresponde a una tasa de error $> 1\%$) con AfterQC (Chen), solamente se consideraron lecturas de una longitud mínima de 50 bp y no más de 10 nucleótidos N. iii) eliminación de lecturas duplicadas usando el programa Geneious Prime. iv) se realizó ensamble de novo usando el algoritmo User% of date del programa Geneious Prime el cual permite examinar una proporción estimada de los datos, sin embargo, se analizó el 100% de ellos. v) se realizó alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST) de nucleótidos para los diferentes *contings* ensamblados y determinar su identidad. Además, se realizamos ensamble contra referencia utilizando el programa de Geneious Prime, para esto se tomaron genomas de referencia de la base de datos de NCBI.

Se utilizaron los siguientes genomas de referencia (Tabla 3).

Tabla 3. Genomas de referencia				
Nombre	Virus	Secuencias	Molécula	Origen
Dengue4 NC_002640-POLY gene	Dengue 4	10,164	RNA	Humano
Dengue3 NC_001475-POLY gene	Dengue 3	10,173	RNA	Humano
Dengue2 Polygene	Dengue 2	10,176	RNA	Humano
gb:MN294937 Organism:Dengue	Dengue 2	10,723	DNA	Mosquito
Zika aislado brasil NC_035889-POLY gene	Zika	10,272	RNA	Humano
gb:MK049247 Organism:Zika	Zika	10,385	DNA	Mosquito
MH643887.1	WNV	11,019	DNA	Caballo
KX547527.1	WNV	10,787	DNA	Caballo
West Nile lineage 1 NC_009942-POLY gene	WNV	10,293	RNA	Humano
West Nile lineage 2 NC_001563-POLY gene	WNV	10,302	RNA	Humano

- **Genotipificación.**

Se identificaron los genotipos a los que pertenecen las secuencias de *Flavivirus* ensambladas, por medio de la construcción de árboles filogenéticos, además se incluyeron secuencias de referencia de cada genotipo. Para la construcción del árbol se utilizó análisis de máxima verosimilitud mediante los programas de MAFFT y iq-Tree2, además, de FigTree para la visualización y edición de los árboles.

- **Análisis de variabilidad de genomas.**

Obtención de secuencias.

Las secuencia de los genoma completo de cada uno de flavivirus secuenciados se obtuvieron de la base de datos *Flavivirus* Virus Pathogen Resource (ViPR). Los criterios de inclusión de las secuencias son: genomas completos, *flavivirus* (DENV2-genotipo asiático-americano/ZIKA-linaje asiático-americano), hospedero (humano/mosquito), tipo de espécimen (plasma/suero/mosquito) y tamaño del genoma (10,000/11,000 pb). Se realizó eliminación de secuencias repetidas y eliminación de secuencias UTR en el caso de las secuencias de aminoácidos por la traducción.

Alineamiento de secuencias.

A partir de las secuencias obtenidas de la base de datos ViPR, se realizó el alineamiento de secuencias de nucleótidos y aminoácidos para cada virus respectivamente derivadas de muestras de humano y mosquito usando, el algoritmo MAFFT versión 7 (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences).

Análisis de diversidad.

Para el análisis de variación en secuencias de nucleótidos y aminoácidos se utilizó el programa Analyze Sequence Variation de ViPR. El consenso es el alelo que supera una frecuencia superior al 50% independientemente la cobertura, si ningún alelo supera el 50%, se coloca N (para nucleótidos) o Xaa (para aminoácidos) para indicar ambigüedad. Las secuencias alineadas se comparan luego con el consenso para identificar polimorfismos.

El puntaje designado a los polimorfismos se calcula usando la formula modificada de la entropía de Shannon para estimar la frecuencia del alelo por posición, la puntuación obtenida es la entropía normalizada de la distribución observada y donde la puntuación para nucleótidos puede oscilar de 0 (sin polimorfismos) y 232 (4 alelos y un indel, con 20% de frecuencia para cada uno).

$$S = -100 * \text{Sum} (P_i * \log_2 P_i)$$

- P_i es la frecuencia del alelo i .
- Sum es la diferencia entre la máxima entropía posible y la entropía de la distribución de símbolo observada.

Análisis de diversidad inter-hospederos.

Los sitios diferenciales entre las secuencias de humano y mosquito se determinaron mediante un análisis comparativo utilizando el programa meta-driven comparative analysis tool (metaCAT) (*Pickett*). Este programa nos permite buscar posiciones alineadas que difieran significativamente entre los dos o más grupos de secuencias, para este trabajo se han definido dos grupos (grupo de secuencias de mosquitos y de secuencias de humano).

A partir de nuestro alineamiento calcula una prueba chi-cuadrada en cada columna del alineamiento, con la finalidad de identificar que tienen una distribución no aleatoria. Se calcula un valor estadístico cuantitativo por variación para todas las posiciones. El valor C calculado es igual al valor p de la chi-cuadrada.

Sin embargo, algunos sesgos como la covarianza, sesgos de codones, diferencias en el genotipo, la geografía, el tiempo de aislamiento, pueden afectar la estimación. Por lo anterior se utilizó una corrección de Bonferroni para el valor de p, de tal suerte que se considera significativa aquella en posiciones con un valor de $p < 0.0000045$.

Análisis filodinámicos.

El análisis filodinámico se llevó a cabo con la finalidad de identificar relaciones evolutivas de las secuencias en su contexto geográfico y temporal.

El programas iq-Tree2 se consideró para el análisis filodinámico, éste utiliza un algoritmo estocástico rápido y eficiente para la reconstrucción de árboles filogenéticos con máxima verosimilitud y se puede obtener escalamiento de las ramas en función del tiempo (*Nguyen, 2015; Chernomor, 2016*).

Resultados.

1.- Obtención de RNA para secuenciación.

En el presente estudio utilizaron extractos de RNA obtenidos de pools de mosquitos colectados en 2016 en los estados de Guerrero y Oaxaca. Los 85 extractos de mosquitos de Guerrero fueron obtenidos, cuantificados y sometidos a detección de arbovirus previo al presente trabajo en el laboratorio de virología del PCG. Se realizó extracción y cuantificación de 143 pools de mosquitos y 46 muestras de plasma humano se obtuvieron para el presente estudio. 58 extractos provenientes de Oaxaca fueron obtenidos y cuantificados también en el Laboratorio de Virología de PCG en el transcurso de la realización del presente trabajo para posteriormente usarlos en la detección de arbovirus realizada en el INER.

Además, se realizó la extracción de RNA de 46 muestras de suero obtenido de pacientes con diagnóstico sugestivo de síndrome febril, originarios del estado de Guerrero. 24 de ellos presentaban síntomas al momento de la toma de muestra (Tabla 4), de las 46, solo 42 alcanzaron la concentración final requerida para la técnica de detección de arbovirus que se utilizó en este proyecto.

Tabla. 4 Características de las muestras de suero humano con los valores de CT									
Numero	Clave	Sexo	Inicio de síntomas	Fecha de toma	Edad	Municipio	Edo	Sintomas al momento de la toma	CT
1	LChS	Femenino	25/08/2016	28/08/2016	23	Tecoanapa	Guerrero	No	27.17
2	MCS	Femenino	10/08/2016	28/08/2016	74	Tecoanapa	Guerrero	No	29.97
3	RRA	Femenino	25/08/2021	28/08/2016	62	Tecoanapa	Guerrero	No	30.05
4	MAR	Femenino	25/08/2021	28/08/2016	35	Huamuchapa	Guerrero	No	30.89
5	MVA	Femenino	20/08/2016	28/08/2016	39	Tecoanapa	Guerrero	No	28.9
6	SCC	Masculino	-	05/09/2016	59	Tecoanapa	Guerrero	No	30.78
7	DDT	Femenino	03/09/2016	05/09/2016	32	Tecoanapa	Guerrero	No	30.01
8	AMS	Femenino	06/08/2016	10/08/2016	24	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.31
9	RAA	Masculino	08/08/2016	10/08/2016	19	Tecoanapa	Guerrero	Si	28.53
10	JCEH	Masculino	07/08/2016	11/08/2016	23	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.33
11	EVR	Femenino	05/07/2016	28/08/2016	27	Tecoanapa	Guerrero	No	30.97
12	IJL	Femenino	06/08/2016	11/08/2015	22	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.49
13	CCE	Femenino	10/08/2016	11/08/2016	30	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.48
14	LCE	Femenino	07/08/2016	11/08/2016	34	Tecoanapa	Guerrero	No	30.86
15	OMG	Masculino	15/08/2016	20/08/2016	22	Cuatepec	Guerrero	Si	30.66
16	BNP	Masculino	16/08/2016	19/08/2016	22	-	Guerrero	No	30.34
17	EAS	Femenino	17/08/2016	19/08/2016	24	-	Guerrero	No	30.6
18	BGL	Masculino	14/08/2016	19/08/2016	66	-	Guerrero	No	30.77
19	MZG	Femenino	15/08/2016	19/08/2016	56	-	Guerrero	No	30.24
20	EMC	Masculino	07/08/2016	11/08/2016	17	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.41
21	IAR	Femenino	11/08/2016	19/08/2016	33	-	Guerrero	No	30.57
22	EGV	Femenino	17/08/2016	19/08/2016	58	-	Guerrero	No	30.99
23	YIRV	Femenino	09/08/2016	11/08/2015	22	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.9
24	MCNP	Femenino	18/08/2016	20/08/2016	20	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.79
25	ICRP	Femenino	25/08/2016	26/08/2016	22	Tecoanapa	Guerrero	Si	29.37
26	RRG	Femenino	01/08/2016	26/08/2016	68	Ayutla de los libres	Guerrero	Si	29.64
27	GRV	Femenino	12/08/2016	21/08/2016	24	Tecoanapa	Guerrero	Si	28.14
28	LAQG	Masculino	10/08/2016	21/08/2016	21	Cuatepec	Guerrero	Si	30.35
29	RLS	Masculino	17/08/2016	21/08/2016	11	Ayutla de los libres	Guerrero	No	30.23
30	NMR	Femenino	23/08/2016	26/08/2016	42	Ayutla de los libres	Guerrero	Si	33.01
31	DSM	Femenino	12/08/2016	21/08/2016	22	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.48
32	ALGH	Femenino	18/08/2016	26/08/2016	30	Ayutla de los libres	Guerrero	Si	30.05
33	BLP	Masculino	13/08/2016	20/08/2016	23	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.23
34	YGR	Masculino	20/08/2016	28/08/2016	20	Tecoanapa	Guerrero	No	27.81
35	JSD	Femenino	17/08/2016	26/08/2016	21	Ayutla de los libres	Guerrero	Si	28.77
36	DMD	Femenino	16/08/2016	21/08/2016	18	Tecoanapa	Guerrero	Si	29.68
37	MRC	Femenino	20/08/2016	28/08/2016	60	Tecoanapa	Guerrero	Si	28.96
38	OCG	Masculino	10/08/2016	19/08/2016	26	Tecoanapa	Guerrero	No	28.72
39	MCC	Femenino	24/08/2016	28/08/2016	42	Tecoanapa	Guerrero	No	20.57
40	VCZ	Masculino	25/08/2021	28/08/2016	31	Tecoanapa	Guerrero	No	27.17
41	CRS	Femenino	26/08/2016	28/08/2016	57	Tecoanapa	Guerrero	Si	29.36
42	LIBR	Femenino	15/08/2016	28/08/2016	25	Tecoanapa	Guerrero	Si	28.96
43	ATC	Femenino	20/08/2016	28/08/2016	32	Tecoanapa	Guerrero	Si	30.09
44	HPCh	Femenino	25/08/2016	28/08/2016	59	Tecoanapa	Guerrero	Si	29.01
45	ITV	Masculino	25/08/2021	28/08/2016	43	Tecoanapa	Guerrero	No	30.51
46	BChV	Masculino	24/08/2016	28/08/2016	48	Tecoanapa	Guerrero	No	27.12

2. Detección de arbovirus.

Como se mencionó anteriormente la detección de arbovirus se realizó en dos rondas, en el 2017 se identificaron en muestras de mosquitos, pupas y larvas positivas a alguno de los arbovirus incluidos en el análisis. Del total de muestras positivas, en 3 muestras se identificó ZIKV, en 4 muestras a Chikungunya y en una DENV3, todas estas originarias de Guerrero (Tabla 5).

Tabla 5. Pools positivos arbovirus 2017		
Muestra	Origen	Virus
1AeH1227	Mosquito/Guerrero	Zika
1AeH1228	Mosquito/Guerrero	Zika
3AeH1228	Mosquito/Guerrero	Zika
AeH1227	Mosquito/Guerrero	Chikungunya
2LG1228	Larvas/Guerrero	Chikungunya
1AeM1228	Mosquito/Guerrero	Chikungunya
6LG1230	Larvas/Guerrero	Chikungunya
1PG1228	Pupa/Guerrero	Dengue3

En el análisis realizado en 2021 se hizo la detección de arbovirus en un total 58 muestras de mosquitos y 42 de humano. De las muestras de mosquito 12 fueron positivas a alguno de los arbovirus considerados en el ensayo de detección: 5 para DENV2, 1 para DENV3 y 6 para WNV; En el caso; de las muestras humanas 4 fueron positivas: 1 para DENV3 y 4 para WNV. Las muestras de mosquito de esta ronda son originarias de Oaxaca y las de humano de Guerrero (Tabla 6).

Tabla 6. Muestras positivas para arbovirus 2021				
Número	Muestra	Espécimen	Virus	CT
1	5m	Mosquito/Oaxaca	Dengue 2 (1/4)	28
2	7m	Mosquito/Oaxaca	Dengue 2 (1/4)	29
3	9m	Mosquito/Oaxaca	Dengue 2 (1/4)	29
4	19m	Mosquito/Oaxaca	WNV (4/4)	19
5	25m	Mosquito/Oaxaca	Dengue 2/3 (1/4)	25
6	29m	Mosquito/Oaxaca	WNV (4/4)	19
7	31m	Mosquito/Oaxaca	WNV (4/4)	20
8	32m	Mosquito/Oaxaca	WNV (4/4)	18
9	33m	Mosquito/Oaxaca	Dengue 2 (1/4)	22
10	36m	Mosquito/Oaxaca	WNV (3/4)	21
11	40m	Mosquito/Oaxaca	Dengue 3 (1/4)	24
12	48m	Mosquito/Oaxaca	WNV (1/4)	21

13	7h	Humano/Guerrero	WNV (3/4)	23
14	17h	Humano/Guerrero	Dengue 4 (4/4)	17
15	24h	Humano/Guerrero	WNV (1/4)	24
16	33h	Humano/Guerrero	WNV (3/4)	23

La tasa mínima de infección de arbovirus en mosquito fue de 13.98%.

3.- Obtención de secuencias.

Del total de muestras positivas a arbovirus se eligieron para la secuenciación masiva las que tenían los valores de CT más bajos, así como el número de sondas a las que cada muestra dio positivo. De esta forma se consideraron 13 muestras, de las cuales 10 eran de mosquitos y 3 provenían de humano (Tabla 7).

Posteriormente se enviaron a secuenciación en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática-Instituto de Biotecnología (USMBIBIT) de la UNAM.

Tabla 7. Muestras enviadas a RNAseq		
Muestra	Origen	Virus
1G	Guerrero/Mosquito	Zika
2G	Guerrero/Mosquito	Zika
3G	Guerrero/Mosquito	Zika
4G	Guerrero/Mosquito	Dengue 3
19-O	Oaxaca/Mosquito	WNV
29-O	Oaxaca/Mosquito	WNV
31-O	Oaxaca/Mosquito	WNV
32-O	Oaxaca/Mosquito	WNV
33-O	Oaxaca/Mosquito	Dengue 2
40-O	Oaxaca/Mosquito	Dengue 3
7H	Guerrero/Humano	WNV
17H	Guerrero/Humano	Dengue 4
33H	Guerrero/Humano	WNV

Características clínicas de las muestras de pacientes enviadas a secuenciar (Tabla 8).

Tabla #. Características demográficas y síntomas de los pacientes						
Clave	Sexo	Inicio de síntomas	Fecha de toma	CT	Edad	Síntomas
7H	F	03/09/2016	05/09/2016	30.01	32	NR
17H	F	17/08/2016	19/08/2016	30.6	24	NR
33H	M	13/08/2016	20/08/2016	30.23	23	Fiebre, Cefalea y Petequias

Abreviaciones: F, femenino; M, masculino; NR, no reportados

Tabla 8. Características demográficas y síntomas de los pacientes						
Clave	Sexo	Inicio de síntomas	Fecha de toma	CT	Edad	Síntomas
7H	F	03/09/2016	05/09/2016	30.01	32	NR
17H	F	17/08/2016	19/08/2016	30.6	24	NR
33H	M	13/08/2016	20/08/2016	30.23	23	Fiebre, Cefalea y Petequias

Abreviaciones: F, femenino; M, masculino; NR, no reportados

4.- Ensamblajes

Para la reconstrucción de las secuencias realizamos ensamble de novo y de referencia, los análisis de calidad de lectura se encuentran en el anexo 1. El número de lecturas, *contigs*, cobertura y *match*, se encuentra en la Tabla 9. Realizamos el ensamble de novo en 7 de las muestras positivas para ZIKV y DENV (1G, 2G, 3G, 4G, 33-O, 40-0 y 17H) al obtener la secuencia se realizó BLAST de nucleótido para determinar la identidad de estas, se obtuvo la secuencia de DENV4 de la muestra 17H (Fig. 21).

Tabla 9. Características de los ensambles								
Muestra	Reads derivados de la secuenciación sin adaptadores	Reads sin duplicados	Mapeo contra genoma de referencia			Ensamble de novo (programa Geneious Prime)		
			Núm. máximo de match con <i>Flaviviridae</i>	Reads mapeados	Cobertura media	Núm. Contigs	Max. Longitud de Contigs	Resultado del ensamble de novo contra el BLAST
1G	24,657,336	7,007,866	51 (Zika)	7,007,866	30	45,485	6,940	Ae. aegypti apolipophorins, mRNA
2G	22,098,834	7,873,472	32 (Zika)	7,873,472	30	39,444	8,933	Ae. aegypti dystonin
3G	23,747,360	6,065,480	87,102 (Zika)	6,065,480	30	37,774	6,952	Anopheles merus large subunit rRNA
4G	24,087,490	9,078,472	50058 (Zika)	9,078,472	30	-	-	-
19-O	20,863,770	6,800,016	2703 (Zika)	6,800,016	30	-	-	-
29-O	21,838,520	8,157,396	60,346 (Zika)	8,157,396	30	-	-	-
31-O	21,531,272	5,800,374	184,412 (Zika)	5,800,374	30	-	-	-
32-O	24,050,356	7,391,480	0	7,391,480	30	-	-	-
33-O	22,986,678	7,649,562	208,344 (Zika)	7,649,562	30	85,129	5,259	Hubei mosquito virus 4
40-O	25,336,954	6,434,434	2 (Dengue 4)	6,434,434	30	-	-	-
7H	4,040,458	2,125,298	4 (Zika)	2,125,298	30	-	-	-
17H	6,790,070	1,496,562	40,100 (Dengue 4)	1,496,562	30	19,983	10,605	Dengue 4
33H	8,424,908	2,075,436	8 (Dengue 2)	2,075,436	30	-	-	-

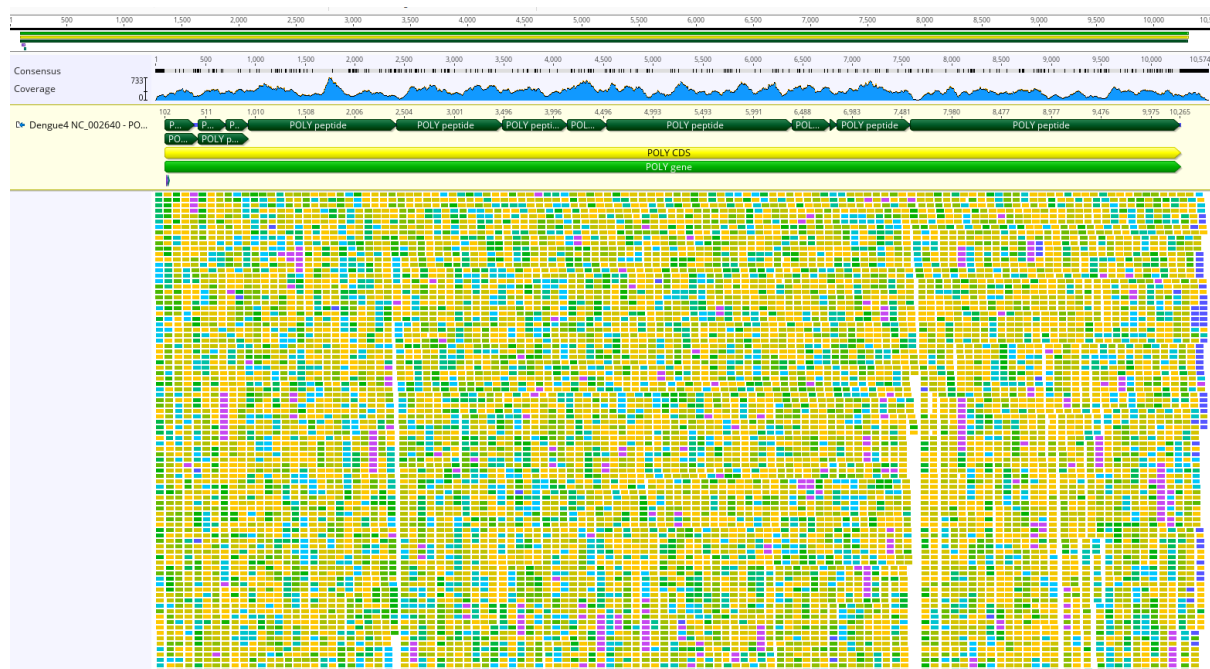


Fig. 21. Ensamble contra genoma de referencia de la muestra H19 positiva para DENV4.

El ensamble de contra genoma de referencia se realizó en todas las muestras, la secuencia completa se obtuvo de la muestra H17 para DENV4 (Fig. 21) y secuencias parciales para ZIKV se obtuvieron para G1 y G2 con *mach* en dentro de la poliproteína (Fig. 22). Para el resto de las secuencias encontramos *mach* en regiones UTR'5 de ZIKV y DENV.

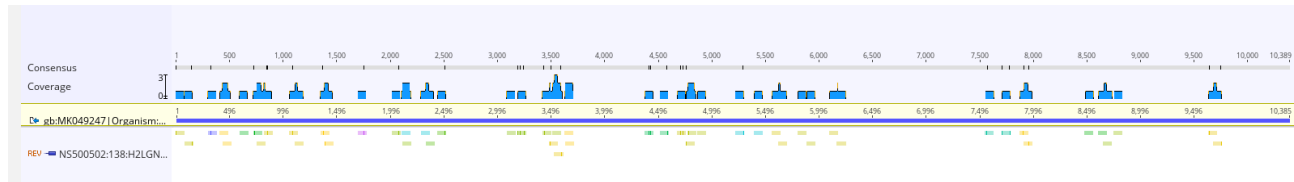


Fig. 22. Ensamble contra genoma de referencia de la muestra G1 positiva para ZIKV.

5.- Genotipificación

Realizamos el genotipificación de la secuencia de DENV4 obtenida de la muestra de H19, la cual se acerca más al genotipo II. Figuras 23 y 24.

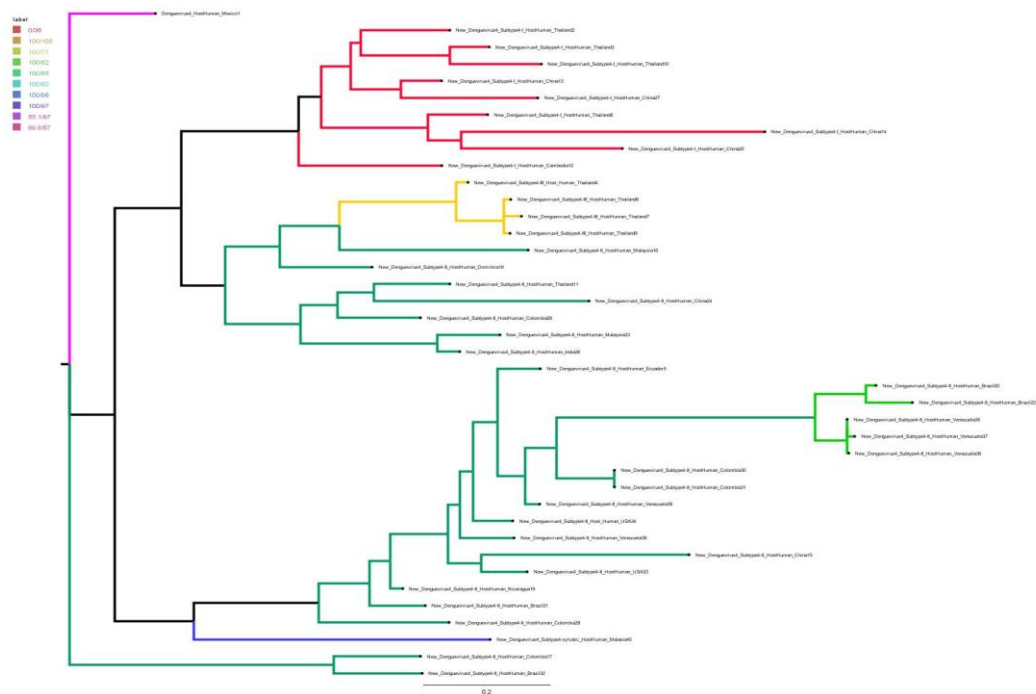


Fig. 23. Árbol filogenético de DENV4 (iq-Tree). Incluye muestras de los 4 genotipos (I, II, III, y IV). genotipo I en color rojo, genotipo II verde, genotipo III amarillo, genotipo IV azul, muestra problema H19 morada. Algunos autores llegan a comentar que pueden ser 5 genotipos.

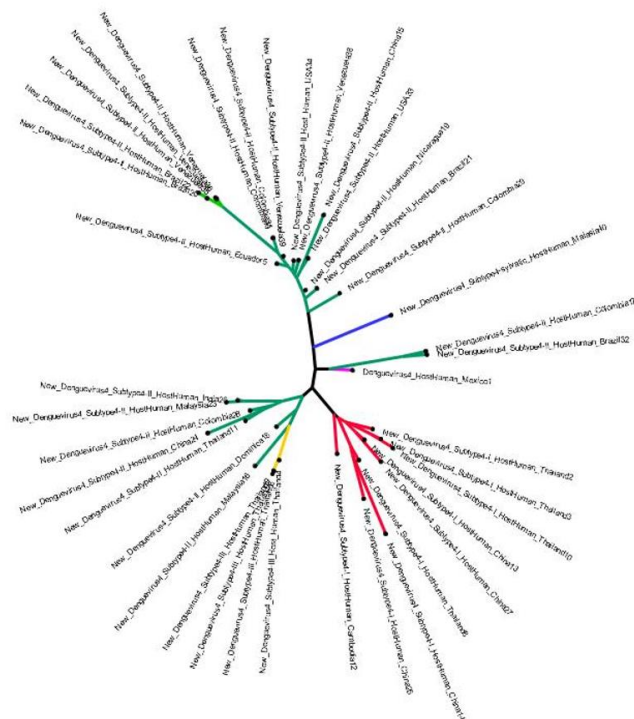


Fig. 24. Árbol filogenético de DENV4 (iq-Tree). Incluye muestras de los 4 genotipos; genotipo I en color rojo, genotipo II verde, genotipo III amarillo, genotipo IV azul, muestra problema H19 morada.

6.- Análisis de variabilidad.

Un total de 1749 secuencias de genomas completos fueron obtenidos de la base de datos ViPR, de acuerdo con nuestros criterios de inclusión por virus; 749 secuencias corresponden a DENV1 genotipo I (628 de humano/121 de mosquito), 99 secuencias de DENV2 genotipo asiático (94 de humano/5 de mosquito) y 49 genotipo asiático americano (44 humano/5 de mosquito) y 509 a ZIKAV linaje asiático (461 de humano/48 de mosquitos).

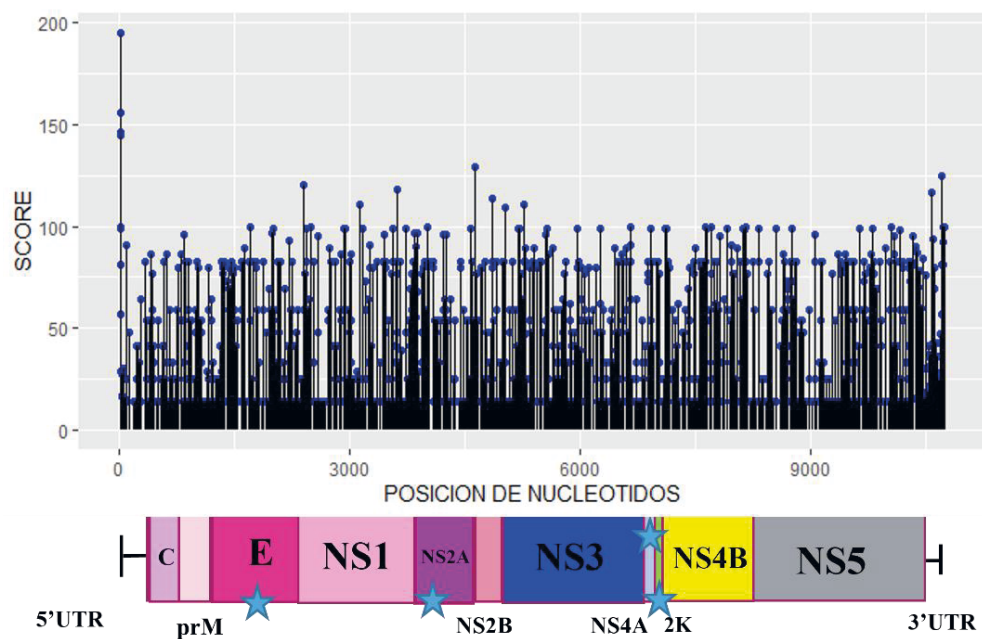
A continuación, se presentan los resultados más representativos que correlacionan con los virus identificados en las muestras analizadas que corresponden a los virus DENV2 genotipo asiático-americano y ZIKAV linaje asiático-americano. Posteriormente se realizó un análisis de variación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos por virus y un análisis comparativo entre secuencias virales obtenidas de hospederos humanos y mosquitos.

Análisis de variación en secuencias de DENV2 genotipo asiático-americano.

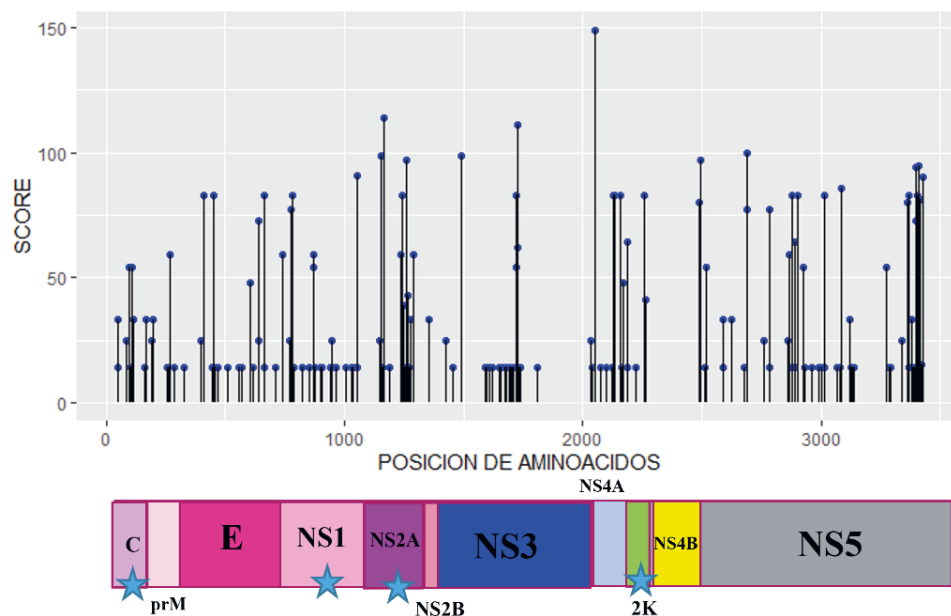
Se realizaron dos análisis de variación el primero se usaron secuencias de nucleótidos y el segundo en el segundo de secuencia de aminoácidos (Gráfica 1 y 2). El análisis de variación de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos muestran que los genomas presentan diversidad a lo largo de la secuencia. Dentro de las proteínas estructurales la proteína E es la

que presenta un mayor número de SNV y dentro de la región no estructural tenemos a las proteínas NS2A, NS4A y el péptido 2K con mayor porcentaje de SNV. En las secuencias de aminoácidos se puede observar un menor número de sitios polimórficos en comparación con la secuencias de nucleótidos, las regiones con mayor variación fueron en la región estructural la proteína C y en la no estructural las proteínas NS1, NS2A y el péptido 2k. La correlación entre ambos análisis se da en las proteínas NS2A y péptido 2K. Las secuencias de nucleótidos presentaron en los extremos UTRs una mayor diversidad sobre todo en el extremo 3'.

GRAFICA 1.- ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE DENV2 GENOTIPO ASIATICO-AMERICANO



GRAFICA 2.- ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE DENV2 GENOTIPO ASIATICO-AMERICANO



Análisis comparativo de la diversidad genética inter-hospedero en DENV2.

Entre secuencias derivadas de humanos y mosquitos identificamos un total de 56 sitios de variación, que son estadísticamente significativos. La secuencia de la proteína C no presenta SNV diferenciales, lo sugiriendo que esta secuencia presenta los mismos patrones de variación en ambos hospederos. La proteína prM es la que presenta mayor número de SNV entre hospederos de la región estructural y en la región no estructural las proteínas NS2B y NS4A fueron los genes con mayor SNV estas proteínas están involucradas en el ensamblaje del virión directamente o indirecta y estas variaciones podrían favorecer el ensamblaje en cada hospedero (Gráfica 3 y tabla 10).

GRÁFICA 3.- ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE SECUENCIAS OBTENIDAS A PARTIR DE HUMANOS Y MOSQUITOS EN DENV2 ASIÁTICO-AMERICANO.

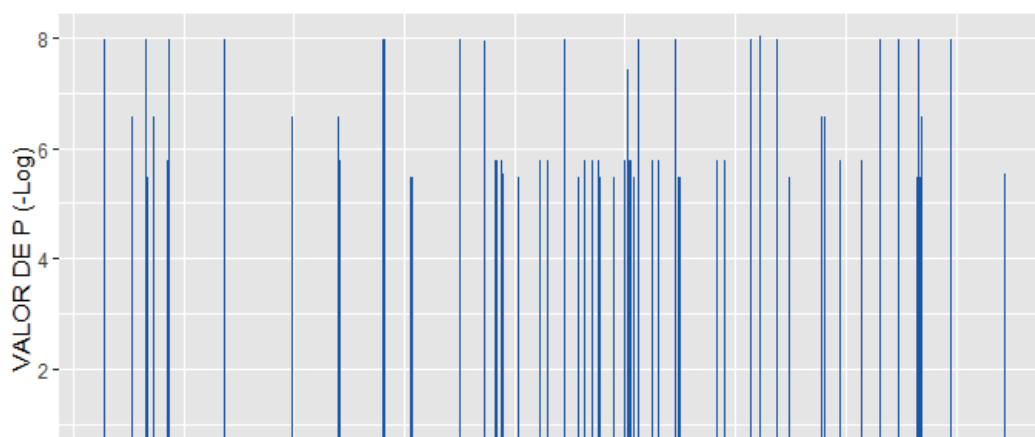


TABLA 10. DISTRIBUCIÓN COMPARATIVA DE SNV SIGNIFICATIVOS EN SECUENCIAS DE DENV1 OBTENIDAS DE HUMANOS Y MOSQUITOS.

DIVISIÓN	PROTEÍNA	PORCENTAJE DE SITIOS DIFERENCIALES	TOTAL DE SITIOS
ESTRUCTURALES	Proteína C	0.29%	0.34%
	proteína prM	0.80%	
	Proteína E	0.20%	
NO ESTRUCTURALES	Proteína NS1	0.28%	0.61%
	Proteína NS2A	0.30%	
	Proteína NS2B	0.25%	
	Proteína NS3	0.97%	
	Proteína NS4A	0.78%	
	Proteína 2K	2.89%	
	Proteína NS4B	0.40%	
	Proteína NS5	0.59%	

Análisis comparativo de secuencias de aminoácidos derivadas de humanos y mosquito de dengue tipo 2 asiático-americano.

En el análisis comparativo entre los dos grupos de secuencias derivadas de mosquitos y humano, se encontraron seis posiciones con significancia estadística, las cuales se distribuyeron a las siguientes proteínas M, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Tabla 11).

Tabla 11. Aminoácidos diferenciales entre los grupos de secuencia de mosquito y los de humano.

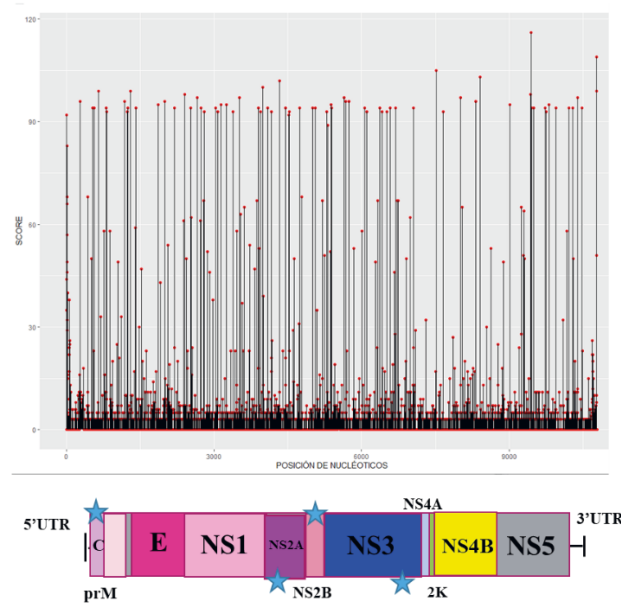
POSICIÓN	AMINOÁCIDO	PROTEÍNA	DOMINIO
795	K265R	M	Flavivirus envelope glycoprotein M
5175	Q1725E	NS3	DEAD-like helicase C (dominio 2)
6156	I2052V/M	NS3	Domain 6
6513	V2171I	NS4A	-
7554	V2518I	NS4B	-
9828	P3276S	NS5	Flavivirus RNA-directed RNA polymerase (dominio 3)

Los aminoácidos en azul son de mosquito, los de rojo de humano. K: lisina, R: arginina, Q: glutamina, E: ácido glutámico, I: isoleucina, V: valina, M: metionina, P: prolina y S: serina

Análisis de variación en secuencias de ZIKAV linaje asiático-americano.

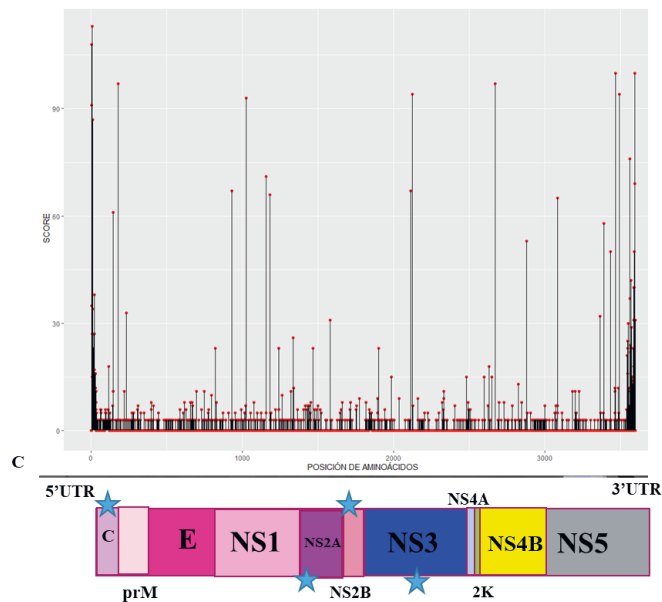
Las secuencias de nucleótidos presenta variación a lo largo de toda la secuencia; sin embargo, al comparar con la secuencia de aminoácidos podemos ver que esta gran variación no está presente (Gráfica 4). Los extremos UTRs en la secuencia de nucleótidos presentaron una mayor frecuencia de variación sobre todo en el extremo 5', esto a diferencia de DENV2 donde fue el extremo 3' el que presento la mayor variación.

GRAFICA 4.- ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE ZIKA LINAJE ASIÁTICO



Dentro de la secuencia de nucleótidos encontramos mayor SNV en la proteína de la cápside y dentro de la región no estructural en las proteínas NS2A, NS2B y NS3, esto sitios correlacionaron también en la secuencia de aminoácidos.

GRAFICA 5.- ANÁLISIS DE VARIACIÓN EN SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE ZIKA LINAJE ASIÁTICO



Análisis comparativo de la diversidad genética inter-hospedero en ZIKAV.

Un total de 29 sitios fueron diferenciales fueron estadísticamente significativos, las dos proteínas con mayor porcentaje de sitios diferenciales fueron E y NS5. En la secuencia de

nucleótidos de la proteína C no se Identificaron sitios diferenciales, lo que podría sugerir es un sitio conservado en ambos hospederos (Gráfica 6 y tabla 12).

GRAFICA 6.- ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE SECUENCIAS OBTENIDAS A PARTIR DE HUMANOS Y MOSQUITOS EN ZIKA LINAJE

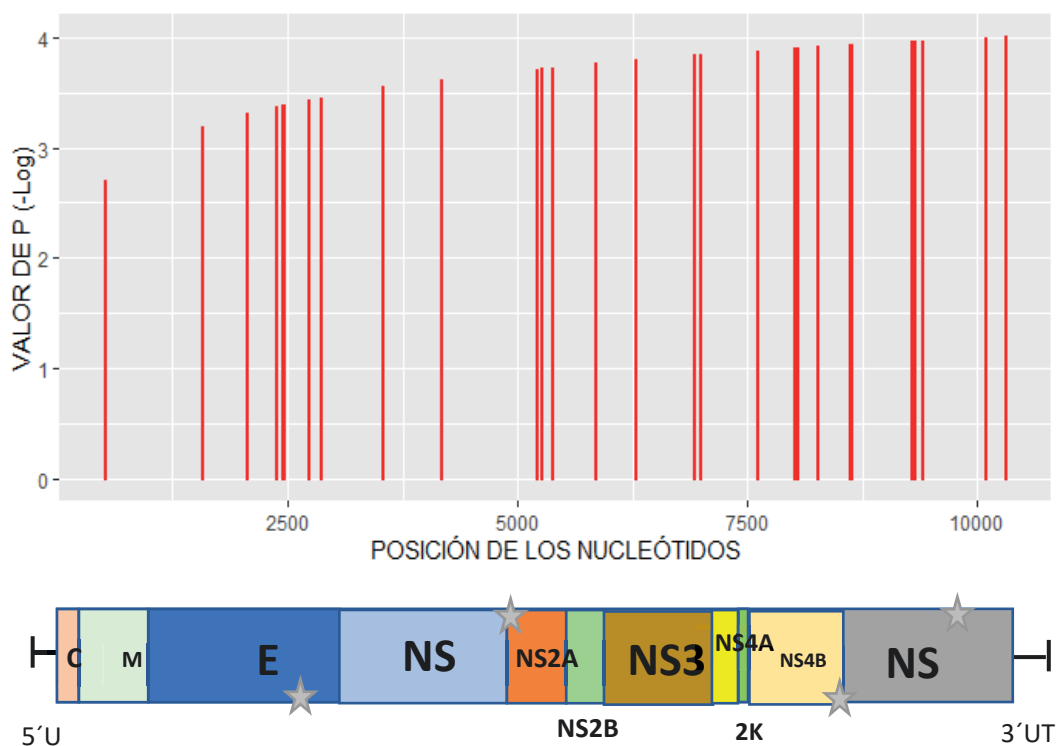


TABLA 12. DISTRIBUCIÓN COMPARATIVA DE SNV ALTAMENTE SIGNIFICATIVOS EN SECUENCIAS DE ZIKAV OBTENIDAS DE HUMANOS Y MOSQUITOS.

DIVISIÓN	PROTEÍNA	PORCENTAJE DE SITIOS DIFERENCIALES	TOTAL DE SITIOS
ESTRUCTURALES	Proteína C	0.00%	0.25%
	Proteína prM	0.27%	
	Proteína E	0.33%	
NO ESTRUCTURALES	Proteína NS1	0.18%	0.29%
	Proteína NS2A	0.29%	
	Proteína NS2B	0.00%	
	Proteína NS3	0.27%	
	Proteína NS4A	0.00%	
	Proteína 2K	0.00%	
	Proteína NS4B	0.39%	
	Proteína NS5	0.40%	

Comparación entre virus. al realizar la comparación entre ambos virus dengue y zika podemos apreciar que son las proteínas no estructurales pequeñas presentan mayor porcentaje de sitios de variación en su secuencia. Al comparar secuencias de nucleótidos con aminoácidos, es muy marcado la disminución que se presente de los sitios de variación, sin embargo, presentamos sesgos en nuestras secuencias ya que se limitan en el número y tiempo de obtención.

Análisis comparativo de secuencias de aminoácidos derivadas de humanos y mosquito de zika linaje asiático-americano.

En el análisis comparativo entre secuencias de aminoácidos derivadas de mosquitos y humanos encontramos cinco sitios diferenciales en las proteínas E, NS3 y NS5.

Tabla 13. Aminoácidos diferenciales entre los grupos de secuencia de mosquito y los de humano.

POSICIÓN	AMINOÁCIDOS	PROTEÍNA	DOMINIO
1578	F526S	E	Central and dimerization domain 2
5205	I1735T	NS3	Flavivirus DEAD, domain 2 helicase C
7608	E2536G	NS5	Domain 1
8013	P2671L	NS5	FtsJ-like methyltransferase
8265	N2755G	NS5	Domain 1

Los aminoácidos en azul son de mosquito, los de rojo de humano. F: fenilalanina, S: serina, I: isoleucina, T: treonina, E: ácido glutámico, G: glicina, L: leucina, N: asparagina.

6.- Análisis filodinámicos.

Análisis filodinámico de Dengue 2 genotipo asiático-1.

Para el análisis filodinámico utilizamos un total de 49 secuencias (44 de humano/5 de mosquitos), obtenidas de países latinoamericanos durante el periodo de 2004 a 2012; podemos observar dos nodos importantes donde se separa las secuencias de humano de Brasil de las secuencias de los demás países, las secuencias de Nicaragua presentan una mayor relación con las secuencias de mosquitos de México, podemos observar que las secuencias de mosquito provenientes de México presentan un número mayor de mutaciones, en comparación con las secuencias de humano, además hay una clara separación de dos nodos de secuencias mexicanas, el primer nodo es exclusivo de secuencias humanas del años 2004 y 2007, el segundo nodo se une una secuencia humana de 2008 con secuencias de mosquito de los años 2009, 2010 y 2012.

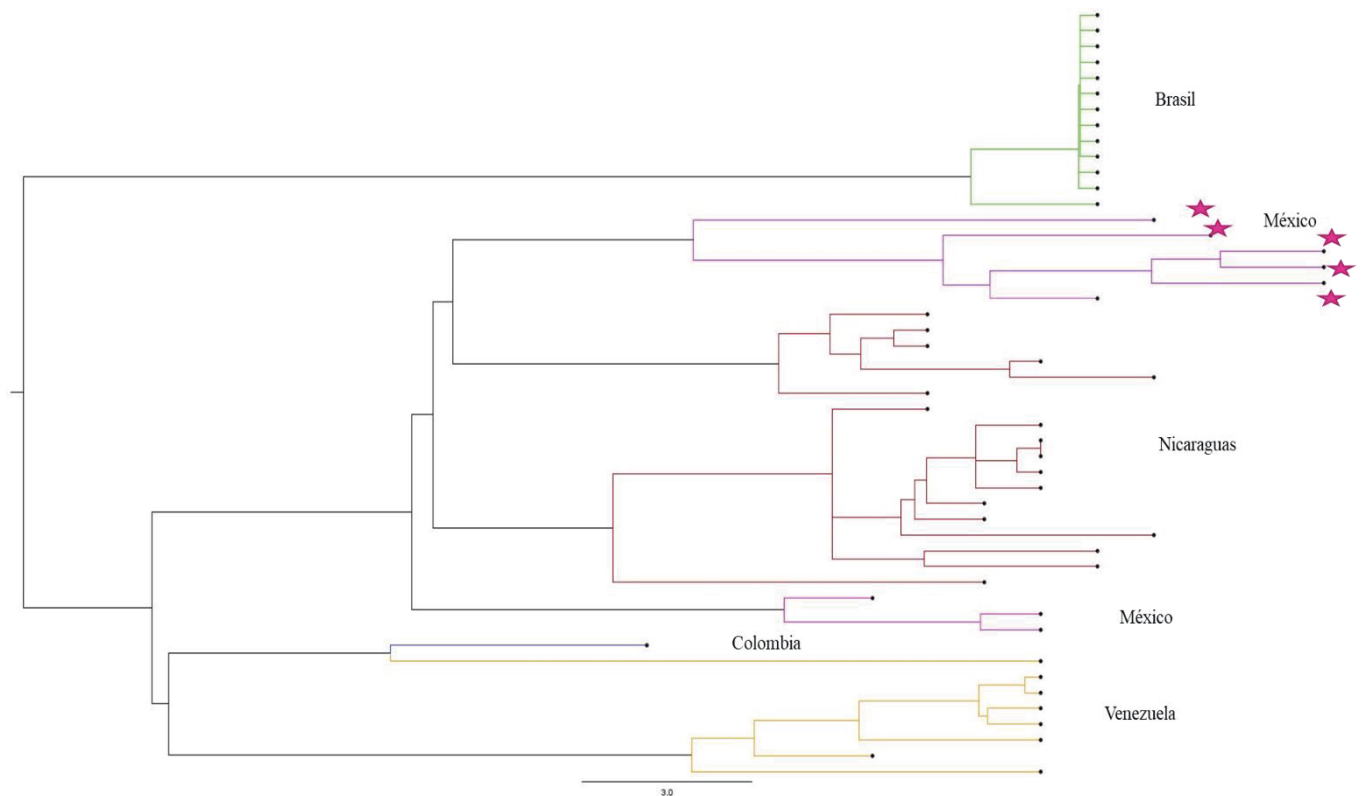


Fig. 25 Análisis filodinámico de secuencias derivas de Dengue 2, genotipo asiático-americano (2004-2012). Las estrellas marcan las secuencias de mosquitos.

Análisis filodinámico de Zika linaje asiático.

El análisis filodinámico representa los últimos 20 años de variación del Zika linaje asiático, cada color representa un país de origen de las secuencias, existe una clara separación entre las secuencias de Indonesia, Japón podemos observar un nodos que agrupan a las secuencias originarias de Japón, Indonesia y Singapur (tonos azules) y otro nodo con el resto de las secuencias, dentro de las demás secuencias existe un nodo con secuencias chinas y de la polinesia francesa que da origen a los demás nodos donde se agrupan los países del continente americano. Esto corresponden con la expansión epidemiología del brote de Zika de 2013 de la Polinesia Francesa y 2015 en Brasil.

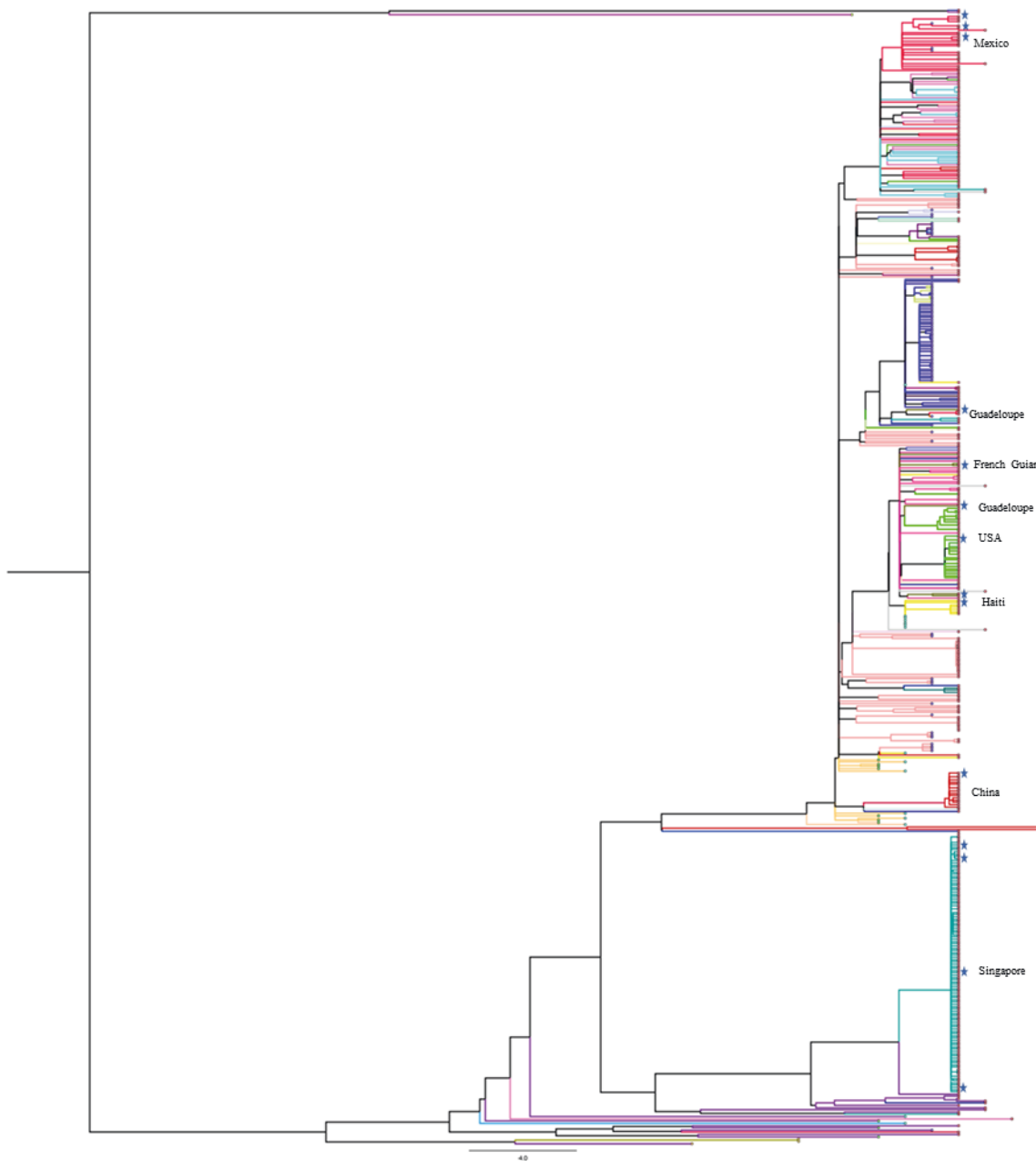


Fig. 26. Análisis filodinámico de secuencias derivadas de Zika linaje asiático. El árbol nos permite seguir el brote epidemiológico de 2014. Las estrellas representan secuencias de mosquitos.

Discusión.

La diversidad genética en arbovirus está sujeta a distintos mecanismos de evolución, donde los procesos de selección natural y deriva génica juegan un papel importante para la fijación y eliminación de SNV en las poblaciones virales; el paso de un hospedero a otro con la consecuente replicación perpetua estos mecanismos. Sin embargo, se cuenta con muy pocos estudios que se centren en lo que sucede en las poblaciones silvestres de estos virus (*Forrester, et al; 2014; Lequime et al, 2016*).

-Identificación de arbovirus y ensamblajes de genomas.

En el presente estudio pudimos identificar diversos arbovirus mediante la técnica de RT-qPCR, en pacientes con diagnóstico de síndrome febril y en muestras obtenidas de mosquito; llama la atención que de las 46 muestras de pacientes solo tres resultaron positivas para la detección de flavivirus, sugiriendo que los pacientes pudieron estar en las fases finales de la infección y por consecuencia tener una carga viral muy baja (*OMS, 2016*). De las tres muestras positivas de humano solo uno presentó manifestaciones clínicas al momento de la toma de la muestra.

En cuanto a los ensamblajes de las secuencias se utilizaron dos métodos que nos permitieron armar diversas secuencias, para el presente estudio se fijó como importante ensamblar de novo los resultados de las muestras que previamente dieron positivo a DENV y ZIKV, siendo estas un total de 6, dentro de nuestros resultados pudimos encontrar proteínas asociadas a mosquitos como apolipoforin y distonina ambas asociadas a la especie *Ae. aegypti*; apolipoforin tiene una función de transportador de lípidos (*UniProtKB-O44534*) y distonina una proteína del citoesqueleto (*Prokop, 2020*); además se documentó virus asociados a mosquitos como el hubei virus de mosquito 4, el cual ha sido recientemente identificado en estudios de metagenómica en mosquitos y pertenecen a la familia de *Tymoviridae* (*He, 2021*) y la secuencia de DENV4.

DENV4 se identificó a partir de una muestra de humano, este serotipo es poco frecuente en el territorio mexicano el cual está predominado por DENV1 y DENV2 (*Arredondo-García, 2020*), realizamos un BLAST y encontramos que la secuencia comparte 99.1% de similitud con secuencias de obtenidas en Estados Unidos de América (EUA).

DENV4 se divide en 4 genotipos I, II, III y IV o silvestre, recientemente se ha propuesto un V genotipo (*Gallichotte, 2018; Tabachnick, 2016*). Realizamos la determinación del genotipo de la secuencia de DENV4 y nos permitió establecer un posible genotipo II, sin embargo, uno de los sesgos al realizar la determinación de este es el bajo número de secuencia disponible para cada uno de los genotipos, la atención que esta secuencia se relacionaba más con secuencias provenientes del continente asiático (*Mendez, 2012; Arredondo-García, 2020*).

Los ensamblajes contra genomas de referencia permitieron la identificación de secuencias parciales para ZIKV en las muestras 1G y 2G obtenidas de mosquito, sin embargo, los *contigs* fueron de una longitud muy corta como para crear una secuencia consenso.

Nuestro estudio nos permite ampliar el conocimiento de las SNV en secuencias obtenidas de mosquitos y humanos de los virus, dengue tipo 2 genotipo asiático-americano y zika linaje asiático, ambos virus tienen una circulación importante en el continente americano y México.

- Análisis de variación de las secuencias

En cuanto a nuestros análisis de diversidad en el caso del dengue tipo 2 genotipo asiático-americano, encontramos que a nivel de secuencias de nucleótidos las regiones con mayor número de SNV fueron la proteína E, NS2A, NS4A y el péptido 2K, sin embargo, en las secuencias de aminoácidos solo se observó este aumento de variación en NS2A y 2K, esto nos sugiere que un número considerable de estos SNV son de tipo sinónimos. NS2A es una proteína que presenta diversas funciones, participa en el ensamblaje del virión regulando el procesamiento de la poliproteína C-prM por la proteasa viral y recluta al RNA genómico a través de la unión al extremo 3'UTR (Reddy, *et al*; 2018). Las funciones del péptido 2K aun no son conocidas, pero fue uno de los sitios de mayor variación.

Otras proteínas que también presentaron mayor sitios de variación a nivel de aminoácidos fue la proteína NS1, el cual desempeña diversos papeles dependiendo su conformación en monómero, dímero o hexámero y está implicado en las interacción con las proteínas NS4A y NS4B a nivel transmembranal y posee una actividad inmunogénica importante y la proteína de cápside implicada en estructural del virus (Hafirassou, *et al*; 2017).

En el análisis comparativo entre secuencias de humano y mosquito en dengue, las dos proteínas con mayor sitios diferenciales fueron prM y NS3. La proteína prM está presente en viriones inmaduros, y es importante para el proceso de maduración viral y la inducción de mecanismos de apoptosis en la células hospedera. La proteína NS3 también tiene múltiples funciones, siendo de las más importantes la función serina proteasa para el procesamiento de la poliproteína y su dominio helicasa que participa en la formación de estructuras secundarias necesarias para la síntesis de RNA (Zou, *et al*; 2015).

Al comparar las secuencias de aminoácidos entre el grupo de humanos y mosquitos, encontramos seis posiciones diferenciales entre ambos grupos; en la proteína M encontramos el uso preferencial de lisina en mosquitos en la posición 265 en comparación con el uso de arginina en humanos, sin embargo, aún no hay estudios sobre esta posición, de los pocos estudios *in vitro* sobre mutaciones en esta proteína se ha estudiado el papel de la histidina en la posición 39 en líneas celulares de *Ae. albopictus* cambios en esta posición por aminoácidos no polares (leucina y prolina) inhiben la replicación del virus (Pryor, 2004).

La proteína NS3 presenta dos sitios diferenciales en la posición Q172E (la glutamina se observó en las secuencias de mosquito y el ácido glutámico en humanos), esta posición corresponde a un sitio DEAD-like helicasa, se sabe poco sus funciones, se cree pueden mediar procesos del sistema inmune innato como sensores de RNA/DNA citosólico, evasión

del sistema inmune e incluso regular la señalización y expresión génica (*Perculija, 2019*), por lo cual sería interesante determinar el potencial papel de este cambio; otro cambio fue el de I2052V o I2052M (isoleucina en las secuencias de mosquito y valina o metionina en las de humano) en el dominio seis de la proteína del cual no se conoce una función en particular. Los estudios de mutagénesis en esta proteína se han centrado en el sitio catalítico de proteasa (*Valle, 1998; Zhu, 2015*)

Los cambios en las proteínas NS4A y NS4B presentaron sustituciones de valina por isoleucina en secuencias de humanos (V2171I en NS4A y V2518I), no encontramos estudios sobre estos sitios, pero el papel de estas proteínas son importantes para el papel replicativo del virus (*Norazharuddin, 2018*).

El último cambio fue P3276S, el aminoácido prolina se encontraba en las secuencias de mosquitos en la proteína NS5, en el dominio tres con actividad de RNA polimerasa, este cambio no se encuentra dentro del sitio catalítico, pero podría favorecer la función de la proteína dependiendo el hospedero.

El análisis de diversidad en zika mostro un menor número de sitios variables en las secuencias de aminoácidos, lo que nos vuelve a sugerir el uso degenerado de codones por parte del virus. Las proteínas con mayor SNV fueron las mismas en secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, siendo la proteína C, NS2A, NS2B y NS3, se comentaron algunas de las funciones de estas proteínas previamente, sin embargo, llama la atención que tanto la proteína NS2B y NS3 presenten mayor diversidad, ya que ellas actúan en conjunto, donde NS2B posee un dominio hidrofílico de control necesario para la actividad eficiente de la proteasa NS3 (*Zou, et al; 2015; Reddy, et al; 2018*).

El análisis comparativo de secuencias de humano y mosquito de zika, los SNV se presentaron en las proteínas E, NS2A, NS4B y NS5. La proteína de envoltura implicada en la entrada del virus a la célula y en estimular la respuesta inmune, la presencia de SNV en esta proteína podría estar involucrada con los cambios necesarios para la entrada a la célula y evasión de la respuesta inmune. La proteína NS5 importante para la replicación del virus por su dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA y un dominio metiltransferasa, esta proteína es muy conservada por lo que habrá que revisar en que sitios caen estos SNV y si tiene alguna repercusión en la función de esta proteína (*El Sahili, et al; 2017*).

Llama la atención que las secuencias de ambos virus son las proteínas pequeñas que presentan cambios significativos, lo cual pudiera sugerir que pueden sufrir modificaciones dependiendo el hospedero, las cuales son necesarias para la replicación en cada especie o ser sitios que están sujetos a selección positiva. Además de otras proteínas con características inmunogénicas como E y NS1.

Al comparar las secuencias de aminoácidos entre ambos grupos encontramos cinco sitio diferenciales F526S en la proteína E, I1735T en NS3, E253G, P2671L y N2755G en la proteína NS5, a diferencia de las mutaciones encontradas en DENV en zika se encontró un mayor numero de ellas en la NS5, sin embargo, estas no se encuentran en el sitio catalítico

de proteína si no en el dominio I y en el dominio con actividad metiltransferasa que pudiera estar tener una repercusión sobre la formación de la caperuza.

- Secuencias UTRs

Los análisis de SNV en secuencias de nucleótidos nos permitieron observar un mayor número de variación en los extremos UTRs, importantes en el proceso de replicación y circularización del virus, evasión de la respuesta inmune por la formación de distintas estructuras terciarias de tipo tallo-burbuja involucradas en los mecanismos de RNAi (*Filomatori, 2011; Clarke, 2015*). En DENV2 se encontró variación en ambos extremos, pero fue mayor en el extremo 3' y en ZIKV fue más evidente en 5'.

- Análisis filodinámico.

Los árboles filodinámico nos permiten identificar relaciones evolutivas entre secuencias de un mismo genotipo y linaje, analizando su contexto geográfico y temporal (*Gtrnfrll; 2004; Volz, 2009*). El árbol del zika nos permitió adentrarnos dentro del brote de 2014, desde su origen en el continente asiático hasta su expansión por toda América Latina, desde un inicio hubo una clara separación de las secuencias de Filipinas y Corea del Sur con el resto de las secuencias. El nodo inferior inicia con secuencias de Camboya y Tailandia, posterior mente de Japón, Singapur y China, para seguir con los países latinoamericanos. Las secuencias de mosquito se intercalan con las de humano de acuerdo con su distribución geográfica, esto nos habrá de que no durante este brote no hubo una ganancia de mutaciones significativas entre hospederos, (*Hu; 2019*).

En contraste las secuencias de dengue nos permitieron obtener una filodinamia exclusiva del continente americano, observando la separación temprana de las secuencias de Brasil del resto y la presencia de dos nodos de secuencias mexicanas con distinta temporalidad, las secuencias de mosquito presentaron una mayor acumulación de mutaciones con respecto a la de humanos. El genotipo asiático-americano es el más común en todo la región de América Latina, la ganancia de SNV puede favorecer su permanencia en esta región. Una limitación de este análisis es el bajo número de secuencias de genoma completo de este virus, evidenciando que el muestreo de los virus circulantes no es temporalmente homogéneo, lo que dificulta observar la transición entre diferentes virus circulantes.

- Otros hallazgos

Dentro de nuestros hallazgos encontramos muestras positivas para otro *flavivirus* el WNV, el cual presenta una gran cantidad de hospederos, dentro de los que destaca el mosquito, humano, aves y caballos, se tienen poca evidencia de la circulación de este virus en nuestro país, Sin embargo, en 2007 se reportó la detección de este virus en mosquitos *Aedes sp* en la península de Yucatán (Mérida y Tixkokob) en mosquitos *Culex sp* en Nuevo León (ejido Francisco Villa) de la especie (*Ibarra-Juarez, et al, 2012; Farfan-Ale, et al, 2009*). Sin embargo, se desconoce los linajes de estos virus, ya que solo se realizó la detección mediante RT-PCR. En nuestro caso como perspectiva de este trabajo se encuentra el ensamblaje de novo de la secuencias de los WNV obtenidos, para determinar los linajes que circularon en

la región de Guerrero y Oaxaca de 2016 y 2018, ya que en el ensamble contra genoma de referencia no se detectaron *match* contra genomas de WNV.

Además, encontramos la presencia de un togavirus, Chikungunya en muestras obtenidas de mosquito en Guerrero durante 2018, que servirán para estudios posteriores, cabe destacar la importancia epidemiológica de este virus, ya que suele dar un cuadro febril similar al dengue y zika (Silva, *et al*; 2017).

Conclusiones y perspectivas

La diversidad genética de los virus de RNA está sujeta a diversos mecanismos evolutivos que permiten el mantenimiento de las poblaciones virales en los distintos ecosistemas, los arbovirus son un grupo heterogéneo de virus transmitidos por artrópodos y dentro de estos es la familia *flaviviridae* la que cuenta con un mayor número de virus asociados a enfermedad lo cual permite que sea un grupo importante para su estudio.

El presente estudio se centró en dos *flavivirus* con importancia epidemiológica para nuestro país DENV y ZIKV tanto por la presencia endémica de DENV y los brotes de ZIKV en los últimos años, el conocer las variaciones de los virus en sus distintos hospederos nos permitirá conocer los diferentes mecanismos que permiten el mantenimiento de los virus, su evolución y proponer estrategias terapéuticas.

Los análisis de variación en secuencias de nucleótido y aminoácidos nos permitieron encontrar sitios donde se acumula un mayor nivel de variación en proteínas no estructurales involucradas en la formación del complejo replicativo, corte de proteasas y ensamble del virión.

Un ejemplo de estas son las proteínas NS2B y NS3, que suelen estar asociadas para el procesamiento de la poliproteína viral.

Otras secuencias en donde se acumula la variación son las proteínas E y NS1 implicadas en la respuesta inmune, entre otras funciones importantes.

El análisis comparativo entre las secuencias de mosquito y humano de dengue encontró sitios diferenciales en las proteínas M, NS3, NS4A y péptido 2K, mientras que en zika fue en las proteínas E, NS2A, NS2B y NS5.

Esto puede sugerir que los cambios observados son necesarios para los procesos de entrada a la célula, respuesta inmune, replicación, procesamiento y ensamblaje del virus en cada hospedero o pueden ser sitios sujetos a selección negativa.

Las secuencias UTRs presentaron también sitios de variación que pueden estar involucrados en procesos de replicación, regulación y respuesta inmune del virus. Sin embargo, se necesitan estudios de predicción de estructuras terciarias y funcionales para determinar el papel de esta variación.

El análisis filodinámico de dengue 2 nos permitió ver los cambios a nivel de secuencias en el genotipo asiático-americano provenientes de América Latina, así como la identificación de dos nodos donde se distribuyen las secuencias mexicanas y siendo las secuencias de mosquito las que presentan un mayor número de variantes adquiridas.

El análisis filodinámico de las secuencias de zika nos permitió seguir la historia natural del brote epidemiológico de 2014, no encontramos una diferencia importante entre las secuencias de mosquito y humano, como se identificó en las secuencias de dengue.

Se logro el ensamble de una secuencia de DENV4 derivado de una muestra de paciente con antecedente de síndrome febril originario del estado de Guerrero y su posible genotipo II, siendo este serotipo uno de los menos comunes circulantes en México. Además, como preliminar pudimos identificar secuencias de virus asociados a mosquitos y proteínas.

Como perspectivas de este proyecto se encuentra la realización de 7 ensamblajes de novo para la mejor caracterización de las diversas muestras, ya que estas eran positivas para WNV el cual no se estudió en el presente estudio; además de la identificación de otros posibles virus y proteínas derivados de mosquitos. Como parte de la extensión de este estudio se realizará el estudio de la secuencia UTRs para determinar cambios en la conformación de las estructuras terciarias de involucradas en estas regiones.

Para finalizar este proyecto permitió la participación en el curso “Herramientas Bioinformáticas para el Análisis de Datos de Secuenciación Masiva” y la presentación del trabajo “Genetic diversity of mosquito and human Zika virus” en el marco del XII Congreso Nacional de Virología organizado por la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Referencias.

1. Aaskov, J., Buzacott, K., Thu, H. M., Lowry, K., & Holmes, E. C. (2006). Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes. *Science*, 311(5758), 236-238.
2. Abascal, F., Posada, D., Knight, R. D., & Zardoya, R. (2006). Parallel evolution of the genetic code in arthropod mitochondrial genomes. *PLoS biology*, 4(5), e127.
3. Alpuche-Lazcano, S. P., McCulloch, C. R., Del Corpo, O., Rance, E., Scarborough, R. J., Mouland, A. J., ... & Gatignol, A. (2018). Higher cytopathic effects of a Zika virus Brazilian isolate from Bahia compared to a Canadian-imported Thai strain. *Viruses*, 10(2), 53.
4. Arredondo-García, J. L., Escalera, C. G. A. L., Lugo-Gerez, J. J. A., Osnaya-Romero, N., Pérez-Guillé, G., & Medina-Cortina, H. (2020). Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(2), 78-83.
5. Avirutnan, P., Hauhart, R. E., Marovich, M. A., Garred, P., Atkinson, J. P., & Diamond, M. S. (2011). Complement-mediated neutralization of dengue virus requires mannose-binding lectin. *MBio*, 2(6), e00276-11.
6. Balsitis, S. J., Coloma, J., Castro, G., Alava, A., Flores, D., McKerrow, J. H., ... & Harris, E. (2009). Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(3), 416-424.
7. Brabant, M., Baux, L., Casimir, R., Briand, J. P., Chaloin, O., Porceddu, M., ... & Jacotot, E. (2009). A flavivirus protein M-derived peptide directly permeabilizes mitochondrial membranes, triggers cell death and reduces human tumor growth in nude mice. *Apoptosis*, 14(10), 1190-1203.
8. Boccolini, D., Toma, L., Di Luca, M., Severini, F., Romi, R., Remoli, M. E., ... & Fortuna, C. (2016). Experimental investigation of the susceptibility of Italian *Culex pipiens* mosquitoes to Zika virus infection. *Eurosurveillance*, 21(35), 30328.
9. Bollback, J. P. (2006). SIMMAP: stochastic character mapping of discrete traits on phylogenies. *BMC bioinformatics*, 7(1), 88.
10. Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2006;11(8):1238-55
11. Carlos, M., Rodríguez-Pérez, C., & Ocaña-Zurita, F. J. (2014). Susceptibilidad y resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue. *Salud en Tabasco*, 20(2), 54-59.
12. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugières P, Fourati S, Cleret de Langavant L, de Broucker T, Brun-Buisson C, Leparac-Goffart I, Mekontso Dessap A. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 2016 Mar 9.

13. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016 Feb 29. pii: S0140- 6736(16)00562-6.
14. Ciota, A. T., & Kramer, L. D. (2010). Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses*, 2(12), 2594-2617.
15. Costa, R. L., Voloch, C. M., & Schrago, C. G. (2012). Comparative evolutionary epidemiology of dengue virus serotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 309-314.
16. Campbell, C. L., Smith, D. R., Sanchez-Vargas, I., Zhang, B., Shi, P. Y., & Ebel, G. D. (2014). A positively selected mutation in the WNV 2K peptide confers resistance to superinfection exclusion in vivo. *Virology*, 464, 228-232.
17. Castrillón-Betancur, J. C., & Urcuqui-Inchima, S. (2017). Overexpression of miR-484 and miR-744 in Vero cells alters Dengue virus replication. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112, 281-291.
18. Clarke, B. D., Roby, J. A., Slonchak, A., & Khromykh, A. A. (2015). Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus research*, 206, 53-61.
19. Chen, S., Huang, T., Zhou, Y., Han, Y., Xu, M., & Gu, J. (2017). AfterQC: automatic filtering, trimming, error removing and quality control for fastq data. *BMC bioinformatics*, 18(3), 91-100.
20. Coffey, L. L., & Vignuzzi, M. (2011). Host alternation of chikungunya virus increases fitness while restricting population diversity and adaptability to novel selective pressures. *Journal of virology*, 85(2), 1025-1035.
21. Conde, J. N., Schutt, W. R., Mladinich, M., Sohn, S. Y., Hearing, P., & Mackow, E. R. (2020). Ns5 sumoylation directs nuclear responses that permit zika virus to persistently infect human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Virology*, 94(19), e01086-20.
22. Collins, N. D., Widen, S. G., Li, L., Swetnam, D. M., Shi, P. Y., Tesh, R. B., & Sarathy, V. V. (2019). Inter-and intra-lineage genetic diversity of wild-type Zika viruses reveals both common and distinctive nucleotide variants and clusters of genomic diversity. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 1126-1138.
23. Dang, T. T., Pham, M. H., Bui, H. V., & Van Le, D. (2020). Whole genome sequencing and genetic variations in several dengue virus type 1 strains from unusual dengue epidemic of 2017 in Vietnam. *Virology journal*, 17(1), 1-10.
24. Dejarnac, O., Hafirassou, M. L., Chazal, M., Versapuech, M., Gaillard, J., Perera-Lecoin, M., ... & Amara, A. (2018). TIM-1 ubiquitination mediates dengue virus entry. *Cell reports*, 23(6), 1779-1793.
25. Dick, O. B., San Martín, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). The history of dengue outbreaks in the Americas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(4), 584-593.

26. Dong, S., Behura, S. K., & Franz, A. W. (2017). The midgut transcriptome of *Aedes aegypti* fed with saline or protein meals containing chikungunya virus reveals genes potentially involved in viral midgut escape. *BMC genomics*, 18(1), 1-17.
27. Dong, H., Fink, K., Züst, R., Lim, S. P., Qin, C. F., & Shi, P. Y. (2014). Flavivirus RNA methylation. *Journal of General Virology*, 95(4), 763-778.
28. Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969-1973.
29. Dzúl-Manzanilla, F., Martínez, N. E., Cruz-Nolasco, M., Gutiérrez-Castro, C., López-Damián, L., Ibarra-López, J., ... & Manrique-Saide, P. (2016). Evidence of vertical transmission and co- circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Guerrero, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(2), 141-144.
30. Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, et al. Evolución molecular del virus Zika durante su aparición en el siglo XX. *PLoS Negl Trop Dis* . 2014; 8 : e2636. 10.1371 / journal.pntd.0002636
31. El Sahili, A., & Lescar, J. (2017). Dengue virus non-structural protein 5. *Viruses*, 9(4), 91.
32. Elong Ngono, A., & Shresta, S. (2018). Immune response to dengue and Zika. *Annual review of immunology*, 36, 279-308.
33. Fahimi, H., Mohammadipour, M., Kashani, H. H., Parvini, F., & Sadeghizadeh, M. (2018). Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(7), 2977-2996.
34. Farfan-Ale, J. A., Loroño-Pino, M. A., Garcia-Rejon, J. E., Hovav, E., Powers, A. M., Lin, M., ... & Blitvich, B. J. (2009). Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(1), 85
35. Filomatori, C. V., Carballeda, J. M., Villordo, S. M., Aguirre, S., Pallarés, H. M., Maestre,
36. A. M., ... & Fernandez-Sesma, A. (2017). Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS pathogens*, 13(3), e1006265.
37. Filomatori, C. V., Iglesias, N. G., Villordo, S. M., Alvarez, D. E., & Gamarnik, A. V. (2011). RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 6929-6939.

38. Fontaine, A., Lequime, S., Moltini-Conclois, I., Jiolle, D., Leparç-Goffart, I., Reiner Jr, R. C., & Lambrechts, L. (2018). Epidemiological significance of dengue virus genetic variation in mosquito infection dynamics. *PLoS pathogens*, 14(7), e1007187.
39. Forrester, N. L., Coffey, L. L., & Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, 6(10), 3991-4004.
40. Forrester, N. L., Guerbois, M., Seymour, R. L., Spratt, H., & Weaver, S. C. (2012). Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population. *PLoS Pathog*, 8(9), e1002897.
41. Giraldo, M. I., Xia, H., Aguilera-Aguirre, L., Hage, A., van Tol, S., Shan, C., ... & Rajsbaum, R. (2020). Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature*, 585(7825), 414-419.
42. Golubeva, V. A., Nepomuceno, T. C., de Gregoriis, G., Mesquita, R. D., Li, X., Dash, S., ... & Monteiro, A. N. (2020). Network of interactions between ZIKA virus non-structural proteins and human host proteins. *Cells*, 9(1), 153.
43. Grubaugh, N. D., & Ebel, G. D. (2016). Dynamics of West Nile virus evolution in mosquito vectors. *Current opinion in virology*, 21, 132-138.
44. Grubor-Bauk, B., Wijesundara, D. K., Masavuli, M., Abbink, P., Peterson, R. L., Prow, N. A., ... & Beard, M. R. (2019). NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. *Science advances*, 5(12), eaax2388.
45. He, X., Yin, Q., Zhou, L., Meng, L., Hu, W., Li, F., ... & Wang, H. (2021). Metagenomic sequencing reveals viral abundance and diversity in mosquitoes from the Shaanxi-Gansu-Ningxia region, China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(4), e0009381.
46. Hussain, M., & Asgari, S. (2014). MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2746-2751.
47. Hu, T., Li, J., Carr, M. J., Duchêne, S., & Shi, W. (2019). The Asian lineage of Zika virus: transmission and evolution in Asia and the Americas. *Virologica Sinica*, 34(1), 1-8.
48. Jerzak, G. V., Bernard, K., Kramer, L. D., Shi, P. Y., & Ebel, G. D. (2007). The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology*, 360(2), 469-476.
49. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;189(8):1411-8.
50. Kang, D. S., Barron, M. S., Lovin, D. D., Cunningham, J. M., Eng, M. W., Chadee, D. D., ... & Severson, D. W. (2018). A transcriptomic survey of the impact of

- environmental stress on response to dengue virus in the mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(6), e0006568.
51. Katzelnick, L. C., Fonville, J. M., Gromowski, G. D., Arriaga, J. B., Green, A., James, S. L., ... & Smith, D. J. (2015). Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*, 349(6254), 1338-1343.
 52. Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WT, et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(9):242-7.
 53. Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S., ... & Lok, S. M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425-428.
 54. Kostyuchenko, V. A., Zhang, Q., Tan, J. L., Ng, T. S., & Lok, S. M. (2013). Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process. *Journal of virology*, 87(13), 7700-7707.
 55. Ibarra-Juarez, L., Eisen, L., Bolling, B. G., Beaty, B. J., Blitvich, B. J., SANCHEZ-CASAS, R. M., ... & FERNANDEZ-SALAS, I. (2012). Detection of West Nile virus-specific antibodies and nucleic acid in horses and mosquitoes, respectively, in Nuevo Leon State, northern Mexico, 2006–2007. *Medical and veterinary entomology*, 26(3), 351-354.
 56. Hardy JL Susceptibilidad y resistencia de los mosquitos vectores. En: Monath TP, editor. *Los arbovirus: epidemiología y ecología*. Vol. 1. CRC Press Inc.; Boca Raton, FL, EE.UU.: 1988. págs. 87-126.
 57. Hafirassou, M. L., Meertens, L., Umana-Diaz, C., Labeau, A., Dejarnac, O., Bonnet-Madin, L., ... & Amara, A. (2017). A global interactome map of the dengue virus NS1 identifies virus restriction and dependency host factors. *Cell Rep* 21: 3900–3913.
 58. Houé, V., Gabiane, G., Dauga, C., Suez, M., Madec, Y., Mousson, L., ... & Failloux, A. B. (2019). Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 1265-1279.
 59. Hapuarachchi, H. C., Koo, C., Kek, R., Xu, H., Lai, Y. L., Liu, L., ... & Maurer-Stroh, S. (2016). Intra-epidemic evolutionary dynamics of a Dengue virus type 1 population reveal mutant spectra that correlate with disease transmission. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.
 60. Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239(4839), 476-481.

61. Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3 Lee, T. C., Lin, Y. L., Liao, J. T., Su, C. M., Lin, C. C., Lin, W. P., & Liao, C. L. (2010). Utilizing liver-specific microRNA-122 to modulate replication of dengue virus replicon. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(3), 596-601.276-3278.
62. Lwande, O. W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., & Bucht, G. (2020). Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(2), 71-81.
63. L.-T. Nguyen, HA Schmidt, A. von Haeseler y BQ Minh (2015) IQ-TREE: Un algoritmo estocástico rápido y eficaz para estimar filogenias de máxima verosimilitud. *Mol. Biol. Evol.* , 32: 268-274.
64. Lequime, S., Fontaine, A., Ar Gouilh, M., Moltini-Conclois, I., & Lambrechts, L. (2016). Genetic drift, purifying selection and vector genotype shape dengue virus intra-host genetic diversity in mosquitoes. *PLoS genetics*, 12(6), e1006111.
65. Li, D., Lott, W. B., Lowry, K., Jones, A., Thu, H. M., & Aaskov, J. (2011). Defective interfering viral particles in acute dengue infections. *PloS one*, 6(4), e19447.
66. Li, P., Wei, Y., Mei, M., Tang, L., Sun, L., Huang, W., ... & Jiang, T. (2018). Integrative analysis of Zika virus genome RNA structure reveals critical determinants of viral infectivity. *Cell host & microbe*, 24(6), 875-886.
67. Li, P., Ke, X., Wang, T., Tan, Z., Luo, D., Miao, Y., ... & Zheng, Z. (2018). Zika virus attenuation by codon pair deoptimization induces sterilizing immunity in mouse models. *Journal of virology*, 92(17), e00701-18.
68. Li, T., Zhao, Q., Yang, X., Chen, C., Yang, K., Wu, C., ... & Ji, X. (2018). Structural insight into the Zika virus capsid encapsulating the viral genome. *Cell research*, 28(4), 497-499.
69. Li, M. J., Lan, C. J., Gao, H. T., Xing, D., Gu, Z. Y., Su, D., ... & Li, C. X. (2020). Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* Aag2 cells in response to dengue virus-2 infection. *Parasites & Vectors*, 13(1), 1-14.
70. Lin, S. R., Hsieh, S. C., Yueh, Y. Y., Lin, T. H., Chao, D. Y., Chen, W. J., ... & Wang, W. K. (2004). Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. *Journal of virology*, 78(22), 12717-12721.
71. Liu, W. J., & Aaskov, J. G. (2018). Fitness peaks of dengue virus populations. *PloS one*, 13(1), e0189554.
72. Liu, S., DeLalio, L. J., Isakson, B. E., & Wang, T. T. (2016). AXL-mediated productive infection of human endothelial cells by Zika virus. *Circulation research*, 119(11), 1183-1189.
73. Liu, Z. Y., Shi, W. F., & Qin, C. F. (2019). The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 131-139.

74. Logan, I. S. (2016). ZIKA-How fast does this virus mutate?. *Zoological Research*, 37(2), 110.
75. Izquierdo-Suzán, M., Zárate, S., Torres-Flores, J., Correa-Morales, F., González-Acosta, C., Sevilla-Reyes, E. E., ... & Yocupicio-Monroy, M. (2019). Natural vertical transmission of Zika virus in larval *Aedes aegypti* populations, Morelos, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 25(8), 1477.
76. Mairiang, D., Zhang, H., Sodja, A., Murali, T., Suriyaphol, P., Malasit, P., ... & Finley Jr, R. L. (2013). Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. *PloS one*, 8(1), e53535.
77. Meaney-Delman D, Hills SL, Williams C, Galang RR, Iyengar P, Hennenfent AK et al. Zika Virus Infection Among U.S. Pregnant Travelers — August 2015– February 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Mar 4;65(8):211-4.
78. Mécharles S, Herrmann C, Poullain P, Tran TH, Deschamps N, Mathon G, et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet*. 2016 Mar 3. pii: S0140-6736(16)00644-9.
79. Moreland, N. J., Tay, M. Y., Lim, E., Rathore, A. P., Lim, A. P., Hanson, B. J., & Vasudevan, S. G. (2012). Monoclonal antibodies against dengue NS2B and NS3 proteins for the study of protein interactions in the flaviviral replication complex. *Journal of virological methods*, 179(1), 97-103.
80. Méndez, J. A., Usme-Ciro, J. A., Domingo, C., Rey, G. J., Sánchez, J. A., Tenorio, A., & Gallego-Gomez, J. C. (2012). Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Virology journal*, 9(1), 1-11.
81. McCrone, J. T., & Luring, A. S. (2018). Genetic bottlenecks in intraspecies virus transmission. *Current opinion in virology*, 28, 20-25.
82. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), 313-319.
83. Mondotte, J. A., Lozach, P. Y., Amara, A., & Gamarnik, A. V. (2007). Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *Journal of virology*, 81(13), 7136-7148.
84. Mukai, T., Lajoie, M. J., Englert, M., & Söll, D. (2017). Rewriting the genetic code. *Annual review of microbiology*, 71, 557-577.
85. Musso, D., & Gubler, D. J. (2016). Zika virus. *Clinical microbiology reviews*, 29(3), 487-524.
86. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2.ed. Washington, DC: OPS, 2016 ISBN 978-92-75-31890-4.

87. Organización Panamericana de la Salud. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. Washington, DC: OPS, 2016. ISBN 978-92-75-31894-2.
88. Öhlund, P., Lundén, H., & Blomström, A. L. (2019). Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus genes*, 55(2), 127-137.
89. Okonechnikov, K., Conesa, A., & García-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 32(2), 292-294.
90. Gabriel, M., Navarro, G. S. C., de Borba, L., Rossi, A. H., Gamarnik, A. V., & Estrada, L. C. (2020). Dengue Virus Capsid Protein Dynamics Reveals Spatially Heterogeneous Motion in Live-Infected-Cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1-13.
91. Norazharuddin, H., & Lai, N. S. (2018). Roles and prospects of dengue virus non-structural proteins as antiviral targets: an easy digest. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 25(5), 6.
92. Panya, A., Sawasdee, N., Junking, M., Srisawat, C., Choowongkomon, K., & Yenchitsomanus, P. T. (2015). A peptide inhibitor derived from the conserved ectodomain region of DENV membrane (M) protein with activity against dengue virus infection. *Chemical biology & drug design*, 86(5), 1093-1104.
93. Parameswaran, P., Wang, C., Trivedi, S. B., Eswarappa, M., Montoya, M., Balmaseda, A., & Harris, E. (2017). Intrahost selection pressures drive rapid dengue virus microevolution in acute human infections. *Cell host & microbe*, 22(3), 400-410.
94. Panyasrivinit, M., Greenwood, M. P., Murphy, D., Isidoro, C., Auewarakul, P., & Smith, D. R. (2011). Induced autophagy reduces virus output in dengue infected monocytic cells. *Virology*, 418(1), 74-84.
95. 32. Peng, Y., Leung, H. C., Yiu, S. M., & Chin, F. Y. (2011). Meta-IDBA: a de Novo assembler for metagenomic data. *Bioinformatics*, 27(13), i94-i101.
96. Pfeiffer, J. K., & Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog*, 1(2), e11.
97. Perčulija, V., & Ouyang, S. (2019). Diverse roles of DEAD/DEAH-Box helicases in innate immunity and diseases. In *Helicases from All Domains of Life* (pp. 141-171). Academic Press.
98. Pielnaa, P., Al-Saadawe, M., Saro, A., Dama, M. F., Zhou, M., Huang, Y., ... & Xia, Z. (2020). Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology*, 543, 34-42.
99. Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A literature review of Zika virus. *Emerging infectious diseases*, 22(7), 1185.
100. Pickett, B. E., Sadat, E. L., Zhang, Y., Noronha, J. M., Squires, R. B., Hunt, V., ... & Zhou, L. (2012). ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. *Nucleic acids research*, 40(D1), D593-D598.

101. Pickett, B. E., Liu, M., Sadat, E. L., Squires, R. B., Noronha, J. M., He, S., ... & Larsen, C. N. (2013). Metadata-driven comparative analysis tool for sequences (meta-CATS): an automated process for identifying significant sequence variations that correlate with virus attributes. *Virology*, 447(1-2), 45-51.
102. Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, A., & Salas, R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México*, 1, 415-435.
103. Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A literature review of Zika virus. *Emerging infectious diseases*, 22(7), 1185.
104. Prokop, A. (2020). Cytoskeletal organization of axons in vertebrates and invertebrates. *Journal of Cell Biology*, 219(7).
105. Priyamvada, L., Quicke, K. M., Hudson, W. H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S., ... & Wrammert, J. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), 7852-7857.
106. Pryor, M. J., Azzola, L., Wright, P. J., & Davidson, A. D. (2004). Histidine 39 in the dengue virus type 2 M protein has an important role in virus assembly. *Journal of general virology*, 85(12), 3627-3636.
107. Reisen, W. K., Meyer, R. P., Presser, S. B., & Hardy, J. L. (1993). Effect of temperature on the transmission of western equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 30(1), 151-160.
108. Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352(9132):971-7
109. Rosenberg, A. Z., Yu, W., Hill, D. A., Reyes, C. A., & Schwartz, D. A. (2017). Placental pathology of Zika virus: viral infection of the placenta induces villous stromal macrophage (Hofbauer cell) proliferation and hyperplasia. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(1), 43-48.
110. Reddy, S. B. G., Chin, W. X., & Shivananju, N. S. (2018). Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. *Biochemical pharmacology*, 154, 54-63.
111. Rodriguez-Roche, R., Blanc, H., Bordería, A. V., Díaz, G., Henningsson, R., Gonzalez, D., ... & Vignuzzi, M. (2016). Increasing clinical severity during a dengue virus type 3 Cuban epidemic: deep sequencing of evolving viral populations. *Journal of Virology*, 90(9), 4320-4333.
112. Roach, T., & Alcendor, D. J. (2017). Zika virus infection of cellular components of the blood-retinal barriers: implications for viral associated congenital ocular disease. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 1-12.
113. Salles, T. S., da Encarnação Sá-Guimarães, T., de Alvarenga, E. S. L., Guimarães-Ribeiro, V., de Meneses, M. D. F., de Castro-Salles, P. F., ... & Moreira,

- M. F. (2018). History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-12.
114. Sexton, N. R., & Ebel, G. D. (2019). Effects of arbovirus multi-host life cycles on dinucleotide and codon usage patterns. *Viruses*, 11(7), 643.
 115. Shafee, N., & AbuBakar, S. (2003). Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *Journal of general virology*, 84(8), 2191-2195.
 116. Shah, P. S., Link, N., Jang, G. M., Sharp, P. P., Zhu, T., Swaney, D. L., ... & Krogan, N. J. (2018). Comparative flavivirus-host protein interaction mapping reveals mechanisms of dengue and Zika virus pathogenesis. *Cell*, 175(7), 1931-1945.
 117. Shrivastava, S., Puri, V., Dilley, K. A., Ngouajio, E., Shifflett, J., Oldfield, L. M., ... & Amedeo,
 118. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007;26(4):283-90.
 119. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(15):1423-32
 120. P. (2018). Whole genome sequencing, variant analysis, phylogenetics, and deep sequencing of Zika virus strains. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
 121. Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosário MS, Costa F, Archanjo G, Santos LA, Nery N Jr, Vasilakis N, Ko AI, de Almeida AR. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Feb 25;10(2):e0004517.
 122. Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *The Journal of clinical investigation*, 127(3), 737-749.
 123. Sim, S., Aw, P. P., Wilm, A., Teoh, G., Hue, K. D. T., Nguyen, N. M., ... & Hibberd, M. L. (2015). Tracking dengue virus intra-host genetic diversity during human-to-mosquito transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(9), e0004052.
 124. Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_10), S935-S944.
 125. Su, C. I., Tseng, C. H., Yu, C. Y., & Lai, M. M. (2016). SUMO modification stabilizes dengue virus nonstructural protein 5 to support virus replication. *Journal of virology*, 90(9), 4308-4319.

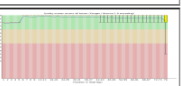
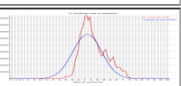
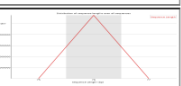
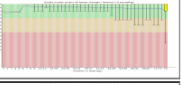
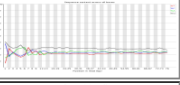
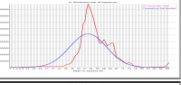
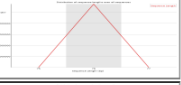
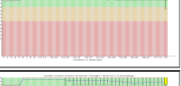
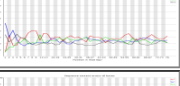
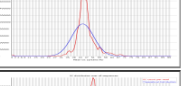
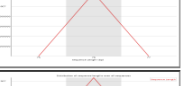
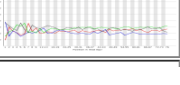
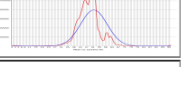
126. Tabachnick, W. J. (2013). Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *International journal of environmental research and public health*, 10(1), 249-277.
127. Takata, M. A., Gonçalves-Carneiro, D., Zang, T. M., Soll, S. J., York, A., Blanco-Melo, D., & Bieniasz, P. D. (2017). CG dinucleotide suppression enables antiviral defence targeting non-self RNA. *Nature*, 550(7674), 124-127.
128. Tan, T. Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V. A., Ng, T. S., Lim, X. X., Zhang, S., ... & Lok, S. M. (2020). Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nature communications*, 11(1), 1-13.
129. Tabachnick, W. J. (2016). Climate change and the arboviruses: lessons from the evolution of the dengue and yellow fever viruses.
130. Twiddy, S. S., Holmes, E. C., & Rambaut, A. (2003). Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Molecular biology and evolution*, 20(1), 122-129.
131. Vasilakis, N., Deardorff, E. R., Kenney, J. L., Rossi, S. L., Hanley, K. A., & Weaver, S. C. (2009). Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS pathogens*, 5(6), e1000467.
132. Valle, R. P., & Falgout, B. (1998). Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. *Journal of virology*, 72(1), 624-632.
133. Uno, N., & Ross, T. M. (2018). Dengue virus and the host innate immune response. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-11.
134. Verbist, B. M., Thys, K., Reumers, J., Wetzels, Y., Van der Borgh, K., Talloen, W., ... & Thas,
135. O. (2015). VirVarSeq: a low-frequency virus variant detection pipeline for Illumina sequencing using adaptive base-calling accuracy filtering. *Bioinformatics*, 31(1), 94-101.
136. Wu, P., Yu, X., Wang, P., & Cheng, G. (2019). Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert reviews in molecular medicine*, 21.
137. Xie, X., Zou, J., Zhang, X., Zhou, Y., Routh, A. L., Kang, C., ... & Shi, P. Y. (2019). Dengue NS2A protein orchestrates virus assembly. *Cell host & microbe*, 26(5), 606-622.
138. Yamanaka, A., & Konishi, E. (2019). Key amino acid Substitution for infection-enhancing activity-free designer dengue vaccines. *Isience*, 13, 125-137.

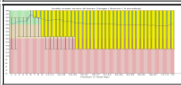
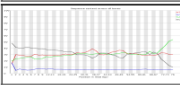
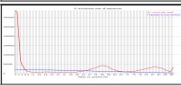
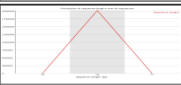
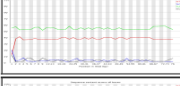
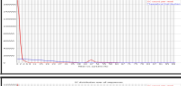
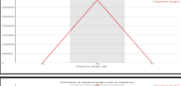
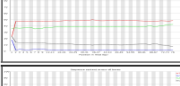
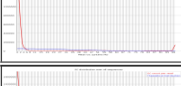
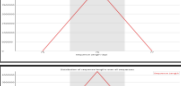
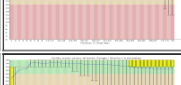
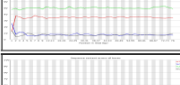
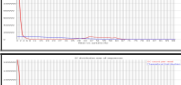
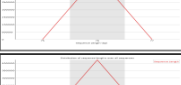
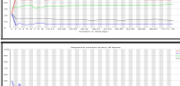
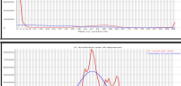
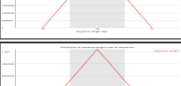
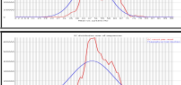
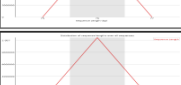
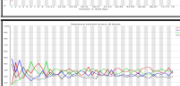
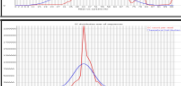
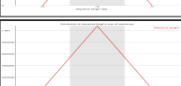
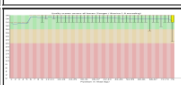
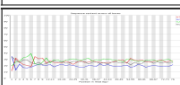
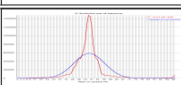
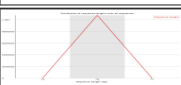
139. Yuan, L., Huang, X. Y., Liu, Z. Y., Zhang, F., Zhu, X. L., Yu, J. Y., ... & Qin, C. F. (2017). A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, 358(6365), 933-936.
140. Zárate, S., Hernández-Perez, F., Taboada, B., Martínez, N. E., Alcaráz-Estrada, S. L., Del Moral, O., & Yocupicio-Monroy, M. (2019). Complete genome of DENV2 isolated from mosquitoes in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 71, 98-107.
141. Zarate, S. and I. S. Novella. 2004. Vesicular stomatitis virus evolution during alternation between persistent infection in insect cells and acute infection in mammalian cells is dominated by the persistence phase. *J. Virol.* 78:12236-42
142. Zhao, L., Alto, B. W., Jiang, Y., Yu, F., & Zhang, Y. (2019). Transcriptomic analysis of *Aedes aegypti* innate immune system in response to ingestion of Chikungunya virus. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3133.
143. Zou, J., Lee, L. T., Wang, Q. Y., Xie, X., Lu, S., Yau, Y. H., ... & Shi, P. Y. (2015). Mapping the interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. *Journal of virology*, 89(7), 3471-3483.
144. Zhu, L., Yang, J., Li, H., Sun, H., Liu, J., & Wang, J. (2015). Conformational change study of dengue virus NS2B-NS3 protease using 19F NMR spectroscopy. *Biochemical and biophysical research communications*, 461(4), 677-680.
145. <https://www.uniprot.org/uniprot/O44534>

Anexo 1. Análisis de calidad de las secuencias.

ID	Muestra	Rendimiento Obtenido (Total Seq)	Rendimiento Solicitado (Total Seq)	Gráfica de calidad	% Nucleótidos por ciclo	%GC	Distribución longitud Secuencia	Secuencias SobreRepresentadas
	1G_S22_R1_001	12,328,668	millones					secuencias
	1G_S22_R2_001	12,328,668	millones					secuencias
	2G_S23_R1_001	11,049,417	millones					secuencias
	2G_S23_R2_001	11,049,417	millones					secuencias
	3G_S24_R1_001	11,873,680	millones					secuencias
	3G_S24_R2_001	11,873,680	millones					secuencias

	4G_S25_R1_001	12,043,745	millones					secuencias
	4G_S25_R2_001	12,043,745	millones					secuencias
	29O_S26_R1_001	10,919,260	millones					secuencias
	29O_S26_R2_001	10,919,260	millones					secuencias
	32O_S27_R1_001	12,025,178	millones					secuencias
	32O_S27_R2_001	12,025,178	millones					secuencias
	33O_S28_R1_001	11,493,339	millones					secuencias
	33O_S28_R2_001	11,493,339	millones					secuencias

33O_S28_R1_001	11,493,339	millones					secuencias
33O_S28_R2_001	11,493,339	millones					secuencias
40O_S29_R1_001	12,668,477	millones					secuencias
40O_S29_R2_001	12,668,477	millones					secuencias

7H_S30_R2_001	2,020,229	millones					secuencias
17H_S31_R1_001	3,395,035	millones					secuencias
17H_S31_R2_001	3,395,035	millones					secuencias
33H_S32_R1_001	4,212,454	millones					secuencias
33H_S32_R2_001	4,212,454	millones					secuencias
19O_S33_R1_001	10,431,885	millones					secuencias
19O_S33_R2_001	10,431,885	millones					secuencias
31O_S34_R1_001	10,765,636	millones					secuencias
31O_S34_R2_001	10,765,636	millones					secuencias
Total:		250454006					